

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**“EFECTO DE TETRAFOSFATO DE GUANOSINA EN
LOS COMPLEJOS DE ELONGACIÓN DE
TRANSCRIPCIÓN BACTERIANA”**

TESIS

Para optar al Título Profesional de

Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Robert Paolo Sosa Príncipe

ASESORES

Dr. Pablo Ramírez Roca

Dr. Daniel Guerra Giraldez

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y

PARASITOLOGÍA

EFFECTO DE TETRAFOSFATO DE GUANOSINA EN LOS
COMPLEJOS DE ELONGACIÓN DE TRANSCRIPCIÓN

BACTERIANA

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

Parasitólogo

Bach. ROBERT PAOLO SOSA PRÍNCIPE

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres Roberto Sosa Sandoval, Clara Elena Príncipe Alva y mi hermano Kevin Arnold Sosa Príncipe que son mi motor en todo.

Al Dr. Carlos Bustamante de la Universidad de California en Berkeley y al Dr. Daniel Guerra de la Universidad peruana Cayetano Heredia (UPCH) por los consejos en la discusión y presentación de datos.

Al proyecto: “*Characterization of wild type and mutant initiation/elongation complexes in Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis using Atomic Force Microscopy and Optical Tweezers*”, Auspiciado por el Forgarty International Center – NIH (EUA).

A la Dra. Manchuta Dangkulwanich, de la Universidad de California en Berkeley, por los consejos y la experiencia brindada en los experimentos durante su pequeña estadía en el laboratorio de moléculas individuales en la UPCH. Además, por la ayuda en el diseño del *scrip* para analizar la distribución de pausas acumulada.

Al Dr. Erick Galburt de la Universidad de Washington en St. Louis y Dr. Yves Coello de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) por el diseño del *scrip* para el análisis general de las trazas de actividad de la RNAP de *E. coli*.

Al Dr. Evgeny Nudler del Langone Medical Center de la Universidad de New York por la purificación de la RNAP biotinilada de *Escherichia coli*.

Al Bach. José Miguel y Lic. Pamela obando por la ayuda técnica brindada durante mis inicios en el uso y mantenimiento del microscopio de pinzas ópticas.

Al Mg. Álvaro López, Bach. Luigui herrera y Bach. Fabiola Valdivia por la ayuda durante la recolección de trazas de actividad.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. Introducción	10
II. Marco teórico	12
1) Transcripción	12
1.1 Elongación	12
I) Elongación activa (<i>on-pathway</i>)	12
II) Pausas (<i>off-pathway</i>)	14
2) RNA polimerasa	17
2.1 Estructura de la RNA polimerasa	18
3) EL tetrafosfato de guanosina	20
4) La respuesta estricta	21
5) El ppGpp y la RNA polimerasa	25
6) Regulación de la expresión del RNA	26
1.1 Efecto en Iniciación	27
1.2 Efecto en elongación	29
III. Hipótesis	31

IV. Objetivos	31
V. Materiales	32
1) Plásmidos y cepas	32
2) Reactivos químicos y Equipos	32
VI. Metodología	36
1) Preparación de DNA para elongación	36
1.1 Preparación de plásmido	36
1.2 Producción de <i>handle</i> a partir de pBGUAPA	36
1.3 Producción del constructo a partir de pPIA2-6	38
1.4 Ligación de constructo y <i>handle</i>	40
2) Formación de complejos detenidos (“ <i>stall</i> ”) de RNAP para pinzas ópticas	41
3) Diseño de microfluidica y geometría del experimento	43
4) Obtención de datos y análisis	45
1.1 Densidad, distribución y media de tiempo de pausas	47
VII. Modelos de la transcripción	50
1) Difusión en pausas	50
2) Cinética básica del <i>on-pathways</i>	55
3) Efecto de ppGpp en la competencia entre el <i>on-pathway</i> y el ingreso a pausas	61
1.1 Primera posibilidad: cambio en la energía de activación	64
1.2 Segunda posibilidad: cambio en el factor pre-exponencial	65
VIII. Resultados	66
1) Análisis de la RNAP de <i>E. coli</i> en elongación	66
2) Velocidad libre pausas de la RNAP de <i>E. coli</i>	66

3) Densidad, tiempo y distribución de pausas	72
4) Difusión en pausas	75
5) Cinética básica del <i>on-pathway</i>	76
6) Competencia entre el <i>on-pathway</i> y el ingreso al <i>off-pathway</i>	78
IX. Discusión de resultados	80
1) El ppGpp duplica la velocidad libre de pausas	80
2) El ppGpp duplica la tasa de difusión de la RNAP	83
3) El ppGpp triplica el factor pre-exponencial del mecanismo difusivo	85
4) El ppGpp no modifica el número de estados del <i>on-pathway</i> ni el valor del k_{cat}	87
5) La regulación por ppGpp y su relación con la estructura de la RNAP	87
6) Modelo de acción del ppGpp en elongación	89
7) La termodinámica de las pausas en la RNAP de <i>E. coli</i>	89
8) Modelo general de mecanismos enzimáticos	91
9) Resumen de constantes cinéticas y termodinámicas	93
X. Conclusiones	94
XI. Recomendaciones	96
XII. Referencias bibliográficas	98
XIII. Anexos	115
1) Calibración del microscopio de pinzas ópticas.	115
2) Ejemplos de ecuaciones para otros modelos en la cinética de motores Moleculares	118
3) Pérdida de memoria en reacciones moleculares	120

ABREVIATURAS

RNAP: RNA polimerasa

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

dwDNA: DNA corriente arriba (*downstream*)

upDNA: DNA corriente abajo (*upstream*)

TLH: *Trigger loop/Helix*

ppGpp: tetrafosfato de guanosina

RE: Respuesta estricta

A: factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius de una reacción de naturaleza difusiva.

NTPs: Nucleótidos trifosfatados

kDa: KiloDaltons

RESUMEN

La respuesta estricta (RE) es una respuesta celular conservada frente al estrés ambiental. En la RE, se produce ppGpp y se genera la reducción de los RNA estables (rRNA y tRNA). Estudios *in vitro* muestran que el ppGpp reduce de la velocidad de transcripción de la RNA polimerasa (RNAP) en los complejos de elongación (CTE) de *Escherichia coli*. Sin embargo, hasta la fecha, no se conoce el mecanismo básico de su accionar. Los estudios de moléculas individuales muestran que la RNAP polimeriza un RNA (estados dentro de la vía de actividad u *on-pathway*) interrumpido por pausas (estados fuera de la vía u *off-pathway*). En el presente estudio se evaluó el efecto del ppGpp en la elongación de los CTE por la microscopía de pinzas ópticas, en tiempo real y a nivel individual. Se observó que el ppGpp duplica la velocidad libre de pausas (11 a 20 nt/s) y mantiene la naturaleza difusiva de las pausas (*off-pathway*). Además, se deduce una ecuación para calcular la energía media de activación en pausas (ε) y se presenta un esquema general (unificación de una cadena Markov y la cinética de Cleland) para el análisis cinético de cualquier reacción enzimática. Gracias a esto se observó que el ppGpp triplica el factor pre-exponencial de la difusión de la RNAP sobre el DNA (24 a 67 s⁻¹); mantiene el número de estados del *on-pathway*, el valor de la constante de catálisis ($k_{cat} \approx 17$ s⁻¹) y la energía de activación en pausas ($\varepsilon \approx 4$ K_BT). Este estudio nos muestra el mecanismo básico de acción del ppGpp en la transcripción: aumento de la tasa de difusión de la RNAP sobre el DNA en una dimensión. Ya que la RE es conservada en bacterias, este conocimiento es de gran interés para el entendimiento del mecanismo de virulencia y resistencia de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, entre otros.

Palabras clave: RNA Polimerasa (RNAP), ppGpp, Complejo ternario de elongación (CTE), *on-pathway*, *off-pathway* y moléculas individuales.

ABSTRACT

The stringent response (SR) is a conserved cellular response against environmental stress. In SR, the ppGpp is produced and this causes the reduction of stable RNA (rRNA and tRNA). *In vitro* studies show that the ppGpp reduces the rate of the RNA polymerase (RNAP) in transcription elongation complexes (CTE). However, to date, the basic mechanism of its action is unknown. Single molecule studies show that RNAP polymerize an RNA (states within the pathway activity or on-pathway) discontinued by pauses (outside the pathway or off-pathway). In the present study, the effect of ppGpp in the elongation of the CTE was evaluated by optical tweezers microscopy, in real time and single molecule level. The results show that ppGpp doubles the free-pause velocity (11 to 20 nt/s) and maintains the diffusive nature of pauses. In addition, I gather an equation to calculate the average activation energy in pauses (ϵ) and a general scheme (unification of a Markov chain and Cleland kinetics) for kinetic analysis of any enzymatic reaction. Thanks to this, the ppGpp triples the pre-exponential factor of the diffusion of RNAP on DNA (24 to 67 s⁻¹); maintains the number states of the on-pathway, the value of the catalysis constant ($k_{\text{cat}} \approx 17 \text{ s}^{-1}$) and the activation energy in pauses ($\epsilon \approx 4 K_{\text{B}}T$). This study shows the basic mechanism of action of ppGpp on transcription: increased diffusion rate of RNAP on the DNA in one dimension. Since the RE is conserved in bacteria, this knowledge is of great interest to the understanding of the mechanism of virulence and resistance of pathogens like *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, and others.

Keywords: RNA Polymerase (RNAP), ppGpp, Elongation ternary complex (ETC), on-pathway, off-pathway and single molecule.

I. INTRODUCCIÓN

Las células ajustan, constantemente, su metabolismo celular en función del cambio ubicuo de las condiciones ambientales (Wu y Xie 2009). En el metabolismo actúan “motores moleculares” o enzimas que convierten la energía química en trabajo mecánico. En bacterias, la “respuesta estricta” (RE) es el principal mecanismo de adaptación frente a cambios y estrés ambiental. La RE es activada por una “alarmona” conocida como ppGpp o guanosina tetrafosfato (Traxler *et al.*, 2008). En *E. coli*, el ppGpp se une a la RNA polimerasa (RNAP), factor de traducción IF2, lisina descarboxilasa, Obg GTPasa, exopolifosfatasa y DNA primasa (DnaG); pero el mayor impacto fisiológico se produce modulando la acción de la RNAP durante la transcripción (Kriel *et al.*, 2013). La transcripción sufre el mayor impacto por el ppGpp ya que, en esta etapa, se produce el primer paso de la expresión del código genético (Bai *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2011).

El ppGpp fue descubierto hace 45 años (Potrykus y Cashel 2008). Sin embargo, hasta la fecha, no se conoce el mecanismo básico de su acción sobre la transcripción. La transcripción se compone de tres pasos básicos: i) Iniciación: unión de la RNAP al promotor y apertura (“melting”) del DNA; ii) Elongación: polimerización del RNA y iii) Terminación: disociación del RNA, RNAP y DNA. El paradigma de la modulación de la transcripción por ppGpp indica que, principalmente, actúa a nivel de la iniciación dependiente del tipo de promotor (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b; Potrykus *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2003; Łyzen *et al.*, 2009; Wagner, 2002; Paul *et al.*, 2004). Los estudios *in vitro* a nivel de elongación son más escasos y su accionar es más oscuro.

Los estudios de manipulación de moléculas individuales han permitido caracterizar la mecanoquímica de motores moleculares con detalle; lo cual no es posible con la

biología molecular y bioquímica tradicional (Bai *et al.*, 2006). Estas técnicas permiten extraer los *dwell time* (tiempo de permanencia en una posición determinada) de la reacción enzimática. Del análisis de los *dwell time*, se ha definido el comportamiento de la RNAP como un trinquete aleatorio, que presenta momentos de elongación activa (*on-pathway*, *dwell time* menores a 1s) e interrumpidos por estados inactivos (pausas) de naturaleza difusiva (*off-pathway*, *dwell time* mayores a 1s) (Mejia *et al.*, 2008; Neuman *et al.*, 2003; Herbert *et al.*, 2008).

En esta tesis presentamos el primer estudio experimental sobre la acción del ppGpp en el *on-pathway* y *off-pathway* de la elongación de la transcripción por la RNAP de *E. coli*. Este conocimiento es de alto interés debido a la comprobada importancia de la RE en el mecanismo molecular de resistencia y virulencia de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (Braeken *et al.*, 2006). Además, se propone un esquema general para el análisis cinético de cualquier reacción enzimática (incluye a cualquier motor molecular); esto es, determinación de: i) el número de estados en una reacción; ii) la naturaleza de las reacciones individuales en el mecanismo (reversibles o irreversibles); iii) qué reacción es dependiente de la concentración de sustrato, producto y/o fuerza; iv) la constante catalítica de forma directa a partir de la distribución de *dwell time*; v) las constantes K_M y V_{max} sin suponer la hipótesis del estado estacionario; vi) el paso mecánico básico en un motor molecular; vii) La ecuación de velocidad y viii) determinación de la energía de activación del *off-pathway*.

II. MARCO TEÓRICO

1) Transcripción.

La transcripción es el proceso de copia de la información genética del DNA en RNA, el cual será leído durante la traducción para formar proteínas y realizar funciones específicas a nivel celular. El paso y uso de la información a través de la transcripción, la traducción del RNA mensajero (RNAm) y la replicación del DNA, constituyen el dogma central de la biología molecular. En estos tres procesos existen motores moleculares encargados de leer, traducir y copiar la información genética (Bustamante *et al.*, 2011). La RNAP es la enzima responsable de la primera etapa de expresión génica: transcribir el código de DNA en RNAm; por esto, la transcripción es un proceso crucial en el control de la expresión de genes (Bustamante *et al.*, 2011; Herbert *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2006). La transcripción es dinámica en función de las condiciones ambientales. La correcta expresión de un grupo de genes determinará la fisiología celular que responde a señales externas como: estrés osmótico, antimicrobianos, exceso de sales, entre otros. La transcripción se compone de 3 pasos básicos: i) Iniciación, ii) Elongación y iii) Terminación.

1.1 Elongación. La fase de elongación es muy compleja. Conceptualmente, se puede separar en una fase de Elongación Activa, asociada a la síntesis de RNA a través de la condensación de nucleótidos y liberación de PPi (“*on-pathway*”), y una fase compuesta por varios estados incompetentes para elongación (“*off-pathway*”), observados como Pausas (Herbert *et al.*, 2008).

i) Elongación Activa (*on-pathway*). La polimerización de un RNA por la RNAP es muy procesiva (Sidorenkov *et al.*, 1998). Cuando se forma un RNA de 9 – 11 nt, la

enzima se libera del promotor y entra a fase de elongación, cuyas principales características son:

- **Estructura y estabilidad.** Compuesto de DNA, RNA y la RNAP, colectivamente conocido como el complejo ternario de elongación (CTE). Este complejo es muy estable ya que soporta hasta 30pN de tensión en la RNAP (Wang *et al.*, 1998). La gran estabilidad se explica por el apareamiento del híbrido RNA-DNA (Kireeva *et al.*, 2000; Sidorenkov *et al.*, 1998), el plegamiento de RNAm naciente (Zamft *et al.*, 2012) y las interacciones DNA-RNAP (Herbert *et al.*, 2008).
- **Translocación.** Es el proceso de desplazamiento del DNA en relación a la RNAP que se coordina con la reacción de condensación de los NTPs. La RNAP realiza pasos de $3.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$ el cual es muy cercano a la distancia entre bases de $3.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$ para DNA-B (Abbondanzieri *et al.*, 2006). Gracias a esta correlación, el modelo más aceptado es el de “*sliding-clamp*”; el cual menciona que la actividad de la RNAP sufre movimientos oscilatorios hacia atrás y hacia adelante sobre el DNA (Forde *et al.*, 2002). La RNAP transloca de forma uniforme pero varía entre moléculas; esto genera una distribución normal y unimodal centrada entre 9 – 15 nt/s (Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 1995; Davenport *et al.*, 2000; Forde *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 1994; Adelman *et al.*, 2002; Neuman *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2001; Mejia *et al.*, 2008).
- **Mecanoquímica.** Es la conversión de energía química en trabajo mecánico. Dos modelos se han propuesto para la translocación de la RNAP: i) El modelo “*Power stroke*” propone que un cambio conformacional genera la translocación acoplado a la hidrólisis del NTP y la liberación de PPi y ii) El modelo “*Brownian ratchet*” menciona que la fluctuación de la enzima entre el estado translocado y no translocado es rectificado por la unión e hidrólisis de NTP en movimiento

unidireccional (Herbert *et al.*, 2008). A la fecha, las evidencias experimentales apoyan fuertemente el modelo *brownian ratchet*. A diferentes concentraciones de NTP y fuerzas sobre los CTE, los datos se ajustan a una relación F vs V de Boltzmann $V(F) = (1 + A)/(1 + A \exp(-F\delta/K_B T))$, donde el parámetro A es adimensional y determina si las transiciones mecánicas o bioquímicas son limitantes en la mecanoquímica; y δ es la distancia del paso individual que realiza la RNAP (Wang *et al.*, 1998).

- **Cinética y termodinámica.** Se han propuesto numerosos modelos cinéticos para el *on-pathway* (Larson *et al.*, 2012; Mejia *et al.*, 2008; Abbondanzieri *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2007; Maoiléidigh *et al.*, 2011); sin embargo, el más actual la descompone en 4 estados (Dangkulwanich *et al.*, 2013): i) Pre-translocado, ii) Pos-translocado, iii) Unión y estabilización de NTP, y iv) crecimiento del RNAm en 1 nt y liberación de pirofosfato (PPi). Los procesos de transformación de i a ii y de ii a iii son reversibles, mientras que el iii-iv es irreversible; sin embargo, solo i-ii es dependiente de la concentración de NTPs. El estado pre-translocado compite con el ingreso a pausas: el ingreso al estado post-translocado es termodinámicamente desfavorecido ($\Delta G > 0$) pero cinéticamente favorecido ($\Delta G_{\text{post}}^+ \approx 2 K_B T$), mientras que las pausas son termodinámicamente favorecidas ($\Delta G < 0$) pero cinéticamente desfavorecidas ($\epsilon \approx 6 K_B T$). De acuerdo al modelo del “*Brownian ratchet*”, la cinética entre el estado i y ii es de la misma naturaleza de las pausas (Dangkulwanich *et al.*, 2013) ver Figura 1.

II) Pausas (*off-pathway*). En la elongación, el estado *on-pathway* se encuentra interrumpido por pausas u *off-pathway* (Herbert *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2006; Larson *et al.*, 2011; Davenport *et al.*, 2000). Las pausas son blanco de acción de

reguladores transcripcionales con NusA (Zhou *et al.*, 2011), NusG, GreA, GreB (Herbert *et al.*, 2010; Shaevitz *et al.*, 2003). La enzima se moviliza en ambas direcciones y sobre el DNA (0 – 5 pb) pero sin polimerización del RNAm (Hodges *et al.*, 2009; Shaevitz *et al.*, 2003). La mejor comprensión del origen de las pausas se ha logrado por el uso de métodos de manipulación individual.

- **Origen.** Hasta la fecha, el modelo más aceptado es que el *off-pathway* es de naturaleza difusiva. Esto se concluye de la adecuación de la distribución del tiempo de pausas a las ecuaciones que suponen un origen difusivo (Depken *et al.*, 2009; Galburt *et al.*, 2007; Xie, 2009; Mejia *et al.*, 2008; Hodges *et al.*, 2009; Zamft *et al.*, 2012). Un origen difusivo indica que el movimiento de la RNAP en pausas es impulsado por la energía térmica del medio.
- **Tipos de pausas.** De acuerdo a su duración, las pausas se dividen en cortas (1 – 20 s), y largas (20 s – 10 min) (Neuman *et al.*, 2003; Maoiléidigh *et al.*, 2011) con desplazamientos estimados de 0 – 2 y 3 – 5 nt, respectivamente (Shaevitz *et al.*, 2003). Las pausas cortas no son sensibles a fuerzas altas (10 pN); mientras que las pausas largas, sí lo son (Neuman *et al.*, 2003). De acuerdo a su origen, éstas se dividen en i) Pausas inducidas por horquillas en el RNAm naciente; ii) *Backtracking*, que es el retroceso de la RNAP sobre DNA río arriba (*upstream*) e introducción del extremo 3'-RNA en el canal secundario de la RNAP; iii) Incorporación errónea (*misincorporation*) o “mecanismo de corrección de errores”, que consiste en la hidrólisis del último nucleótido 3'-RNA debido a una incorporación errónea por la RNAP; y iv) Pausa elemental, la cual es un estado común a todas las mencionadas y no se produce desplazamiento (Herbert *et al.*, 2008).

Ciclo de adición de nucleótidos (Polimerización)

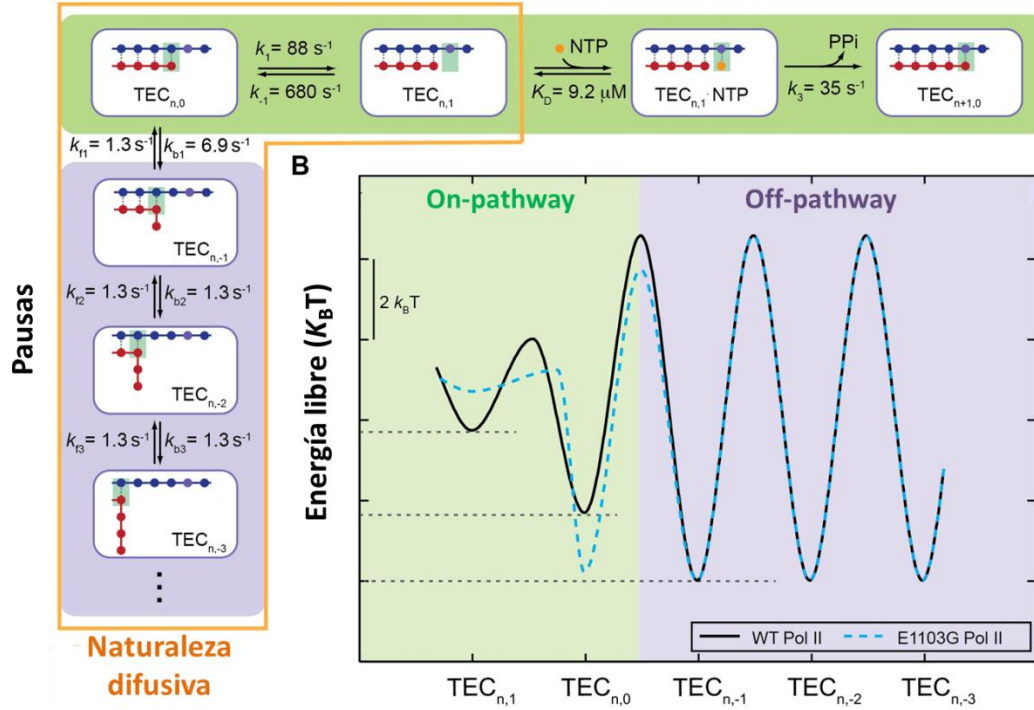


Figura 1. Mecanismo propuesto para la elongación de la RNAP II (Pol II) de *S. cerevisiae*. *On-pathway* (región verde): $TEC_{n,0}$ es el estado pre-translocado (sin crecimiento del RNAm y sin retroceso), $TEC_{n,1}$ es el estado pos-translocado (sin crecimiento del RNAm y con avance de 1 pb), $TEC_{n,1} \cdot NTP$ es el estado pos-translocado unido a los NTPs, y $TEC_{n+1,0}$ es estado final (crecimiento del RNAm en 1 nt). Se observa que la interconversión entre $TEC_{n,0} \rightleftharpoons TEC_{n,1}$ y $TEC_{n,1} \rightleftharpoons TEC_{n,1} \cdot NTP$ son reversibles; mientras que el último paso es conocido como la catálisis química (condensación de NTPs en el RNAm). *Off-pathway* (región morada): $TEC_{n,-1}$, $TEC_{n,-2}$, $TEC_{n,-3}$, etc. son los estados de pausas con retroceso (backtracking) de 1, 2 y 3 pb, respectivamente. Según el modelo del *brownian ratchet* las pausas (k_b, k_f), el ingreso a pausas (k_{b1}) y la cinética entre $TEC_{n,0}$ y $TEC_{n,1}$ (k_1, k_{-1}) son de naturaleza difusiva, es decir comparten el mismo factor pre-exponencial si se modela cada constante de velocidad como un proceso Arrhenius. En el diagrama energético se observa que el ingreso a pausas es termodinámicamente favorable ($\Delta G = -2 K_B T$) pero cinéticamente desfavorable ($\Delta G_{b1}^+ = 6 K_B T$); mientras que el ingreso al estado pos-translocado ($TEC_{n,1}$) es termodinámicamente desfavorecido ($\Delta G = +2 K_B T$) pero cinéticamente favorecido ($\Delta G_1^+ = 4 K_B T$). El diagrama fue modificado de Dangkulwanich *et al.*, 2013.

- **Energética.** Hasta la fecha, la energía de activación no se ha calculado. Se estima que dicha energía es semejante a la ruptura de pares DNA-DNA y DNA-RNA ($\approx 8 K_B T$); ya que, en pausas, la longitud del híbrido DNA-RNA del sitio activo y el DNA en interacción con la RNAP se mantiene constante a pesar de su movimiento (Sidorenkov *et al.*, 1998; Geszvain y Landick, 2005; Dangkulwanich *et al.*, 2013). Dangkulwanich *et al.*, (2013) mencionan que el ingreso a pausas son termodinámicamente favorecido ($\Delta G = -2 K_B T$) pero cinéticamente desfavorecido ($\varepsilon \approx 6 K_B T$) en relación al *on-pathway* (Figura 1). Durante el nacimiento del RNAm, solo en el *backtracking*, la energía de activación se incrementa en ΔG_{RNA} debido a la formación de estructuras secundarias o terciarias (Zamft *et al.*, 2012).

2) RNA polimerasa.

La RNA polimerasa (RNAP) es la enzima encargada de la transcripción de genes. La RNAP reconoce secuencias específicas (promotores) y transcribe los genes bajo el control de las mismas. Las RNAP multiméricas se conservan en todos los organismos vivos y están formados por las subunidades básicas α^I , α^{II} , β , β' y ω . En bacterias, la RNAP se encarga de la síntesis de todos los RNAs (RNAm, RNAt y RNAr) y existe en dos formas: núcleo y holo. La RNAP núcleo se compone de $\alpha_2\beta\beta'\omega$ con un peso aproximado de 400 kDa; mientras que la RNAP holo (holoenzima) se compone de $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ y tiene un peso de 470 kDa (para σ^{70}) (Ebright, 2000). La RNAP núcleo puede realizar la catálisis, pero no tiene especificidad por promotores; cuando se asocia con la subunidad sigma (σ) se reconocen promotores específicos.

2.1 Estructura de la RNA polimerasa.

La estructura de la forma holo de la RNAP de *E. coli* y *T. thermophilus* se han determinado con alta resolución: 3.7 y 2.6 Å, respectivamente (Vassylyev *et al.*, 2002; Murakami, 2013). Para ambas, se observa que la RNAP tiene la forma de una “pinza de cangrejo”, donde la hendidura constituye el sitio activo y el sitio de unión al DNA. En el sitio activo se forma el híbrido DNA-RNA y se mantiene las interacciones con el dwDNA) y upDNA (Murakami, 2013). Las pinzas (*pincers* o *jaws*) se forman por el *clamp* y el *jaw*, de las subunidades β' y β , respectivamente (Chakraborty *et al.*, 2012), ver Figura 2A. A diferencia de la RNAP de *T. thermophilus*, la RNAP de *E. coli* tiene el β' *clamp* en una conformación más cerrada en la enzima núcleo, holoenzima y en los complejos elongación, 7.5 Å desde el átomo C α del $\sigma 2$ a la punta del β -*jaw* [$\beta 371$ -380] (Murakami, 2013). En el sitio activo (β') se ubican los dominios *Trigger loop/helix* (TLH) y *Bridge helix* encargados de la unión, hidrólisis y adición NTPs (Larson *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010; Yuzenkova y Zenkin, 2010), ver Figura 2B; y el motivo DFDGD, del dominio *double-psi* β *barrel* (PDBB), encargado de quelar dos Mg⁺² para formar complejos de coordinación con los NTPs (Mechold *et al.*, 2013). Además del sitio activo, la RNAP tiene un canal para el ingreso de los NTP (canal secundario, de 10 – 12 Å de diámetro) y salida del RNAm naciente (Geszvain y Landick, 2005), ver Figura 2A.

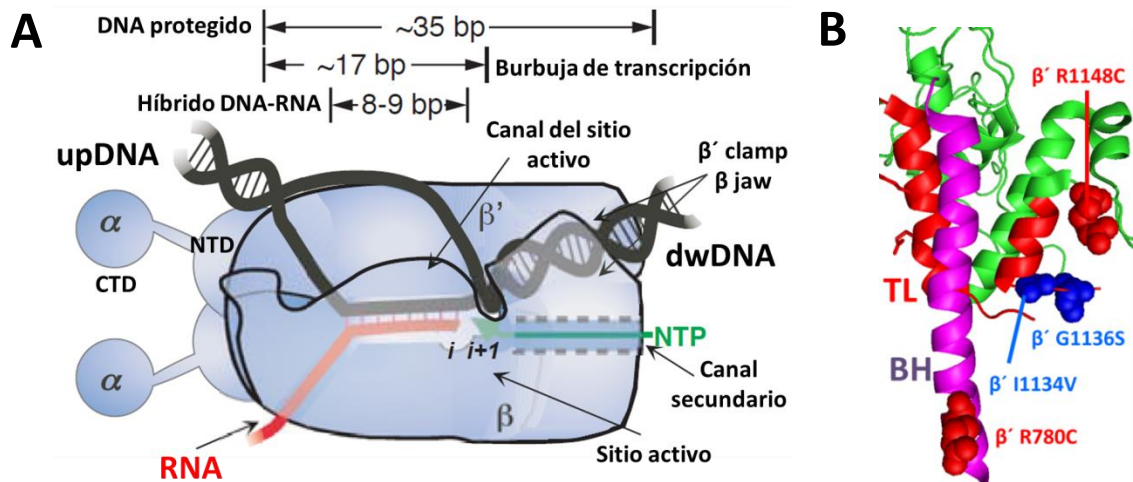


Figura 2: Representación de las zonas y dominios importantes de la RNAP. **A)** Esquema de la RNAP donde se observan que cada subunidad α se une a β y β' a través de los dominios C-terminal (CTD), y estos se conectan entre sus dominios N-terminal (NTD). Las subunidades β y β' forman el sitio activo, el canal secundario, el canal primario (ingreso de DNA), el canal de salida del RNA y DNA, y las pinzas de la RNAP (β' clamp y β jaw). Las pinzas ajustan al dwDNA. Se observa que el híbrido DNA-RNA (8-9 pb) se forma downstream al sitio activo, mientras que la burbuja de transcripción (hebras de DNA separadas) tiene una longitud aproximada de 17 pb y la RNAP protege un DNA de 35 pb. **B)** Representación en modelo cinta del Trigger loop/helix (TL) y el Bridge helix (BH) (PDB 4IGC): en esferas se muestran las mutaciones $\beta' R780C$ y $\beta' R1148C$ que mimetizan la acción del ppGpp en la RNAP (RNAP “estricta”) (Barker *et al.*, 2001b), mientras que $\beta' I1134$ y $\beta' G1136S$ generan RNAP con velocidad de 8 y 19nt/s, respectivamente, diferente a 12nt/s de la RNAP silvestre (Mejia 2009). La imagen A fue modificada de Geszvain & Landick, 2005.

El borde delantero del TLH ($\beta'930-941$ y $\beta'1130-1137$) se encuentra desorganizado (*trigger loop*) y, cuando interacciona con los NTPs, se pliega en dos α -hélices (*trigger helix*) para posicionar de forma estérica a los reactantes para la catálisis (Yuzenkova y Zenkin, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Por esta razón, se le conoce como *Trigger loop/helix* (TLH). El TLH de la RNAP de *E. coli* tiene una gran inserción (Eco $\beta'i6$, $\beta'942-1129$) que separa al TLH en dos regiones: TLH I ($\beta'930-941$) y TLH II ($\beta'1130-1137$). El *loop* es formado por los residuos $\beta'930-933$ (TLH I) y $1133-1138$ (TLH II).

(Murakami, 2013). Eco β' 6 tiene importante función a nivel de la formación de complejos abiertos (R_{Po}), el ingreso a pausas en elongación y terminación de la transcripción; pero en ausencia de DNA, se encuentra desorganizado (Murakami, 2013). Las dos subunidades α idénticas interaccionan con β y β' , y con secuencias represoras y activadoras *upstream* del promotor.

La subunidad α se compone del dominio C (α CTD) y N-terminal (α NTD), conectado por un puente (13-36 aminoácidos). El α NTD participa en la interacción con activadores y represores; en la dimerización e interacción con la RNAP; mientras que el α CTD, con el upDNA y factores de transcripción (Ebright, 2000). El α CTD tienen un *helix hairpin helix* (HhH) para la unión a elementos UP en el upDNA (Geszvain y Landick, 2005). La subunidad omega (ω), es la más pequeña y se ubica en la base de β' (Murakami, 2013). La subunidad ω favorece la unión del β' al subensamblaje $\alpha_2\beta$, impide la agregación y aumenta la estabilidad de β' (Ebright, 2000) y forma el sitio de unión del (p)ppGpp (Zuo *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2013; Mechold *et al.*, 2013).

3) El Tetrafosfato de guanosina.

El (p)ppGpp (ppGpp, “punto mágico I” [MSI]; pppGpp, “punto mágico II” [MSII]) fue descubierto en 1969 por Cashel y Gallant, mediante autoradiografía, en extractos de *E. coli* en un medio deficiente en aminoácidos (Potrykus y Cashel, 2008). Estas moléculas son el interruptor fisiológico y sello distintivo de la respuesta estricta y derivan del GTP/GDP y ATP. La guanosina tetrafosfato (ppGpp, guanosina 3'-bifosfato, 5'-difosfato) y pentafofosfato (pppGpp, guanosina 3'-bifosfato, 5'-trifosfato), colectivamente son conocidos como (p)ppGpp (Dalebroux y Swanson, 2012). La concentración intracelular de ppGpp es regulada mediante la actividad hidrolasa y sintasa de las enzimas RSH (homólogos de Rel

y Spo; RelA y SpoT en *E. coli*). RelA y SpoT mantienen los niveles basales de ppGpp (10 – 20 μM) en condiciones normales (Kriel *et al.*, 2013). Los genes *rsh* se encuentran en eubacterias, cloroplastos y arqueas (Potrykus y Cashel, 2008). Las proteínas RSH tienen, en la región N-terminal, dominios catalíticos para la hidrólisis (3'-pirofosfohidrolasa Mn^{+2} -dependiente; motivo His-Asp [HD]) y, bajo determinadas condiciones, actividad de síntesis (3'-quinasa). Sin embargo, RelA tiene el dominio de hidrólisis inactivo (motivo HD inactivo) (Potrykus y Cashel, 2008; Chatterji y Ojha, 2001). En la síntesis, el ATP transfiere un pirofosfato al extremo 3' del GDP/GTP para formar ppGpp/pppGpp y AMP (Figura 3). Durante la respuesta estricta, el ppGpp funciona como un segundo mensajero de la escasez de nutrientes y estrés; produciendo efectos globales en el perfil de transcripción mediante la unión a la RNAP en bacterias Gram-negativas (Chatterji y Ojha, 2001).

4) Respuesta estricta.

La respuesta estricta (RE) es una respuesta bacteriana conservada que controla la adaptación celular frente a la escasez de nutrientes y estrés (Chatterji y Ojha, 2001). Durante la respuesta estricta, se afectan los procesos de división celular, motilidad celular, replicación del DNA, síntesis de RNA ribosomal (RNAr) y RNA de transferencia (RNAt), síntesis de ribosomas, síntesis de proteínas, inicio y elongación de la traducción, biosíntesis de nucleótidos, metabolismo de transporte, síntesis de fosfolípidos y metabolismo oxidativo, de forma negativa; mientras que la biosíntesis de aminoácidos, síntesis del factor sigma S (σ^S), síntesis de proteínas de estrés (*Hsp60*), metabolismo de carbohidratos, genes de virulencia, sistemas de toxina/antitoxina, resistencia a antibióticos, síntesis de ácidos grasos y sistemas de proteólisis, de forma positiva (Braeken *et al.*, 2006; Chatterji y Ojha, 2001).

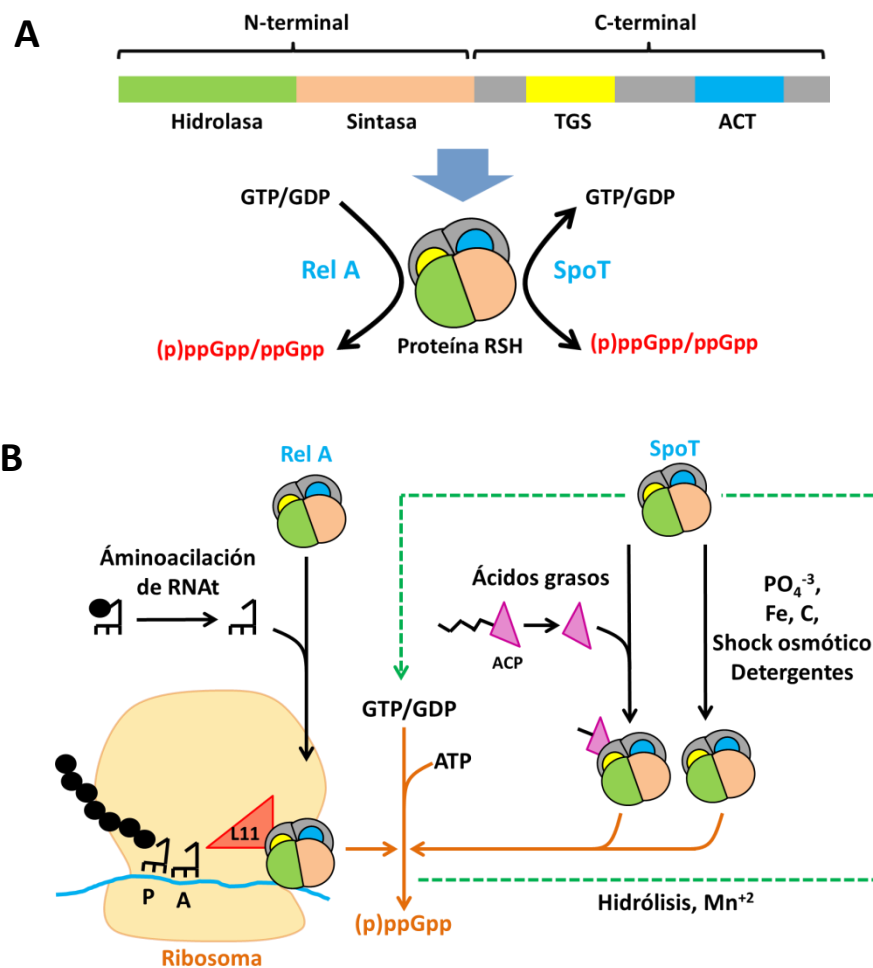


Figura 3. Esquema de la regulación del ppGpp. **A)** Estructura primaria de las proteínas RSH (RelA y SpoT en *E. coli*) con los dominios conservados: hidrolasa (verde), sintasa (crema), TGS (amarillo) y ACT (Azul). Cuando se pliega, RelA solo tiene actividad sintasa (motivo HD inactivo y triada ExDD); mientras que SpoT puede sintetizar e hidrolizar ppGpp (motivo HD activo y triada RxKD); **B)** Regulación del ppGpp en *E. coli*. RelA se estimula por la deficiencia de aminoácidos; mientras que SpoT, por deficiencia de ácidos grasos, fosfato (PO₄³⁻), hierro (Fe), carbono (C), shock osmótico y detergentes. La actividad sintasa de RelA se activa por el reconocimiento de un RNAt no cargado y se une al sitio A del ribosoma, a través de la proteína ribosomal L11 (rojo). La síntesis (flechas naranjas) de ppGpp estimula la liberación del RelA del ribosoma. SpoT se regula por días vías. i) La proteína transportadora de acilos (ACP) (triángulo morado), sin ácidos grasos, se une a la región TGS del C-terminal (CTD) de SpoT y estimula la síntesis de ppGpp. ii), La actividad hidrolítica (flechas verdes, Mn²⁺-dependiente) genera GTP o GDP liberando un pirofosfato. Imagen modificada de Potrykus y Cashel, 2008.

Las características distintivas de la RE son el detenimiento del crecimiento, producción de (p)ppGpp y reducción rápida de la expresión de RNAr y RNAt (Wagner, 2002; Kriel *et al.*, 2013; Braeken *et al.*, 2006). Durante la RE, en *E. coli* los niveles de ppGpp aumentan de 10 – 20 μ M hasta un rango de 120 – 240 μ M (Potrykus y Cashel, 2008). El RNAr y RNAt (colectivamente conocidos como RNA estables) conforman el 95% del total del RNA de una célula bacteriana y controlan el crecimiento celular (Paul *et al.*, 2004). Esto se debe a: i) Las proteínas (generadas por ribosomas) cumplen funciones vitales a nivel celular; ii) La tasa de síntesis ribosomal es proporcional al cuadrado del crecimiento celular, iii) La síntesis de RNAr es limitante en la producción de ribosomas y iv) el RNAr y RNAt trabajan en conjunto durante la traducción (Wagner, 2002; Paul *et al.*, 2004; Jin y Cabrera, 2006). Durante el crecimiento óptimo la producción de RNA ribosomal abarca más del 80% del total de RNA celular y la RNAP se agrupa en operones ribosomales llamados focos de transcripción semejantes a nucléolo (Jin y Cabrera, 2006; Cabrera y Jin, 2003), ver Figura 4. Se estima que en dichos focos se produce una iniciación de operon ribosomal (*rrn*)/s y se encuentran 1 RNAP/85 pb en elongación, mientras que en otros lugares del genoma esta cifra es de tan solo 1 RNAP/10000 – 20000 pb. Durante la respuesta estricta, se observa 0 – 4 iniciaciones de *rrn*/min, una distribución uniforme de la RNAP en el citoplasma y poca expresión de RNA estables (Jin y Cabrera, 2006).

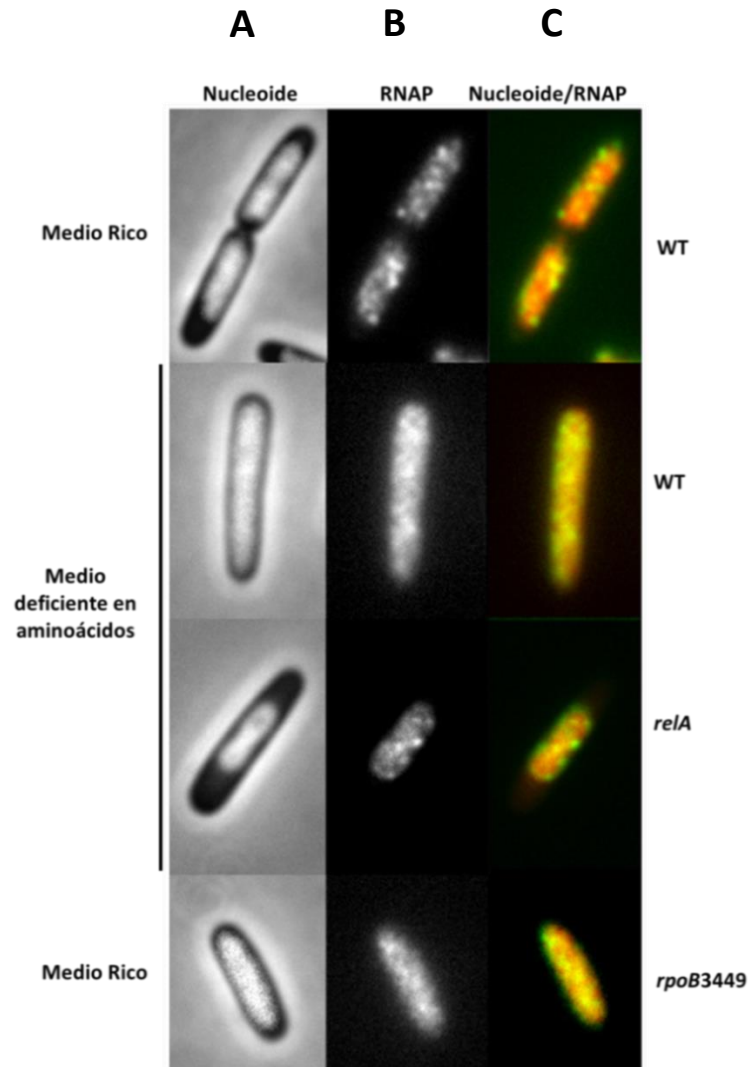


Figura 4. Efectos de la respuesta estricta en dos mutantes de RNAP de *E. coli* que confieren fenotipos diferentes sobre la distribución de la RNAP y el nucleoide. **A)** Corresponde solo al nucleoide; se observa compactado en un medio rico en nutrientes en la RNAP silvestre y la mutante *relA* (no produce (p)ppGpp). Mientras que, en deficiencia de aminoácidos (inducido con 100 μ g/ml de serina hidroxamato por 30 min), la RNAP silvestre y la mutante *rpoB3449* tienen el nucléolo relajado. **B)** Corresponde a la distribución de la RNAP (β -GFP); se observan focos de transcripción en un medio rico para la RNAP silvestre y la mutante *relA*. Sin embargo, los focos de transcripción se pierden asociado a la RNAP silvestre en deficiencia de aminoácidos y en la mutante RNAP “estricta” *rpoB3449*. **C)** Se superponen el nucléolo (naranja) y la distribución de RNAP (verde). Imagen obtenida de Jin y Cabrera, 2006.

5) El ppGpp y la RNA polimerasa.

En *E. coli*, el ppGpp se une a la RNA polimerasa (RNAP), factor de traducción IF2, lisina descarboxilasa, Obg GTPasa, exopolifosfatasa y DNA primasa; pero el mayor impacto fisiológico se produce modulando la acción de la RNAP (Kriel *et al.*, 2013). El sitio de unión del (p)ppGpp, a la holoenzima RNAP- σ^{70} , se ha determinado recientemente con una resolución de 3.9 – 4.2 Å (Mechold *et al.*, 2013) y 4.5 Å (Zuo *et al.*, 2013).

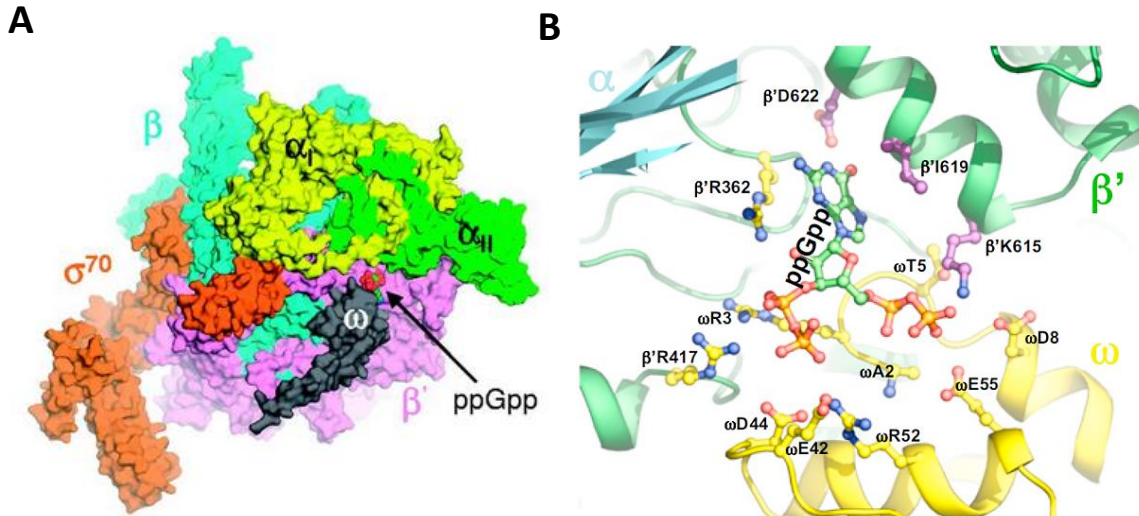


Figura 5. A) Estructura general del complejo RNAP- σ^{70} de *E. coli* unido al ppGpp; en la representación de superficie: α_1 (amarillo), α_2 (verde), β' (lila), β (turquesa), ω (gris) y σ^{70} (naranja); el ppGpp se representa en modelo de esferas en su sitio de unión. **B)** Detalle de los residuos de la región N-terminal de la subunidad β' y ω que interaccionan con el ppGpp. La base guanina del ppGpp se encuentra rodeada por los residuos D622, I619 y R362 de β' ; el 5' pirofosfato interacciona con A2, T5, D8 y E55 del ω y K615 del β' ; y el 3' pirofosfato, con R3, E42, D44 y R52 del ω y R417 de β' . Imagen tomada de Mechold *et al.*, 2013.

El ppGpp se une a un bolsillo cargado positivamente ubicado en la interfase de la región N-terminal de las subunidades β' y ω (a 28 Å del sitio activo). La base guanina del ppGpp interacciona con D622 de β' . El 5' pirofosfato interacciona con los aminoácidos A2, T5, D8 y E55 de ω y K615 de β' ; mientras que el 3' pirofosfato, con R3, E42, D44 y R52 de ω y R417 de β' (Zuo *et al.*, 2013), ver Figura 5. Estos residuos han sido corroborados en estudios de *crosslinking* con P-6-thio-ppGpp (Ross *et al.*, 2013). El sitio de unión se encuentra en el dominio “*double-psi β -barrel*” (DPBB) de β' (Mechold *et al.*, 2013). Este dominio forma parte del sitio activo mediante el motivo DFDGD conservado, donde los residuos Asp (D) coordinan iones Mg^{+2} ; además, blanco de mutaciones compensatorias en RNAP resistentes a rifampicina y se encuentra conservado en las RNAPs (Mechold *et al.*, 2013).

6) Regulación de la expresión de RNA.

El ppGpp produce la rápida reducción de la expresión de RNA estables; y estimula la expresión de genes necesarios para adaptarse a condiciones de estrés. El control de la expresión de RNAr es el modelo de estudio para el control por ppGpp. El control de la expresión de RNAr es uno de las mayores cuestiones sin resolver en el campo de la microbiología molecular por más de 50 años (Murray *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004). *E. coli* tiene 7 operones ribosomales (*rrnA-H*). Por cada operón hay dos promotores (*rrn* P1 y *rrn* P2); ambos con cajas -10 y -35 reconocidos por σ^{70} . Los promotores P1 son más fuertes que P2 durante fase exponencial; esto se debe, principalmente, a la presencia de elementos UP (ricos en A+T), *upstream* de -35. Los elementos UP incrementan la expresión en 300 veces (Paul *et al.*, 2004). Seis de los promotores P1 inician con ATP y el *rrnD* P1, con GTP; estos nucleótidos son conocidos como nucleótidos iniciales o iNTPs (Murray *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004). EL RNAr es controlado, principalmente a nivel de la iniciación (Murray *et al.*, 2003). Existen diversas formas de regulación de los

promotores *rrn*: 1) La proteína Fis genera una regulación positiva mediante el secuestro de la RNAP; 2) La proteína H-NS inhibe la expresión de RNAr favoreciendo la iniciación abortiva; 3) Los NTP iniciales (iNTP) regulan positivamente mediante el incremento del tiempo de vida de los complejos abiertos (RPo); y 4) El (p)ppGpp regula negativamente por disminución del tiempo de vida de los RPo (Barker *et al.*, 2001b; Murray *et al.*, 2003). Sin embargo, Fis y H-NS no participan en la regulación rápida de RNAr ya que es difícil sintetizar proteínas de *ново* en ausencia de nutrientes. De acuerdo a lo anterior, el ppGpp junto a los iNTP son los reguladores más importantes en la expresión del RNAr; sin embargo, solo el (p)ppGpp lo es durante la respuesta estricta (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b; Murray *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004). El ppGpp funciona, probablemente de forma alostérica, mientras que los iNTP mediante la ley de acción de masas (Schneider *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos se han propuesto para el control de la expresión de RNA por ppGpp:

1.1 Efecto en iniciación. La iniciación se compone de la formación de complejos cerrados (unión de RNAP al promotor, RPc) seguido del complejo abierto (apertura del promotor, RPo).

- Efectos en la formación del RPo: El (p)ppGpp afecta la vida media de los complejos RPo de los promotores *rrn* P1 ya que estos presentan una vida media en un orden menor de los promotores no afectados por ppGpp (por ejemplo: promotores de genes para la síntesis de aminoácidos como P_{HisJ} o P_{ArgI}), ver Tabla 1 (Schneider *et al.*, 2003). Esto indica que la modulación positiva o negativa no se debe a una interacción diferencial del ppGpp con la RNAP, sino a la cinética de asociación Promotor-RNAP (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b). Se ha observado que en los complejos RPo del λP_R , el

DNA se envuelve alrededor de la RNAP (fenómeno conocido como “*wrapping*”) y el ppGpp lo desenrolla (Rodríguez, 2011; Bardales, 2012). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha relacionado el *wrapping* con la fuerza del promotor λP_R *in vivo*. Los promotores con larga vida no son inhibidos ya que estos escapan a la fase de elongación antes de que el complejo RP_o colapse en presencia de ppGpp (Paul *et al.*, 2004). Este modelo es consistente con la observación de mutantes de *rrnB* P1 con alta vida que no son inhibidos por ppGpp (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b).

- Efecto en el escape del promotor: El promotor λP_R , que forma complejos RP_o de larga duración, aproximadamente 6 h (Łyzen *et al.*, 2009), ha mostrado el incremento de la iniciación abortiva en presencia de ppGpp; a pesar que la estabilidad del RP_o también es afectada, pero en menor grado (Potrykus *et al.*, 2002).
- Formación de complejos cerrados (RP_c): En el promotor *rrnB* P2, se ha observado que el ppGpp favorece la formación de complejos RP_c (Wagner, 2002). Heinemann y Wagner (1997) proponen el modelo de “*trapping mechanism*”. Este modelo menciona que el ppGpp produce un cambio conformacional de la RNAP, se producen complejos RP_c más estables, el equilibrio entre RP_o y RP_c se desplaza hacia RP_c y la discriminación de los promotores regulados por ppGpp se produce en etapas tempranas de iniciación (Wagner, 2002; Heinemann y Wagner, 1997).
- Efecto en la síntesis inicial del RNA: El ppGpp puede formar puentes de hidrógeno con citosinas en la hebra no complementaria de DNA en la RNAP de *T. thermophilus* (Artsimovitch *et al.*, 2004). Sin embargo, simples y dobles sustituciones en citosinas en la posición -1 y -2 en *rrnB* P1 no reducen el efecto

del ppGpp en el tiempo de vida los complejos RPo de la RNAP de *E. coli* (Paul *et al.*, 2004).

Tabla 1. Respuesta de promotores al ppGpp y su asociación con el tiempo de vida de los complejos abiertos (RPo). Fuente: Schneider *et al.*, 2003.

Promotor	Vida media de RPo (min)	Inhibido por ppGpp
<i>rrnB</i> P1	<0.25	Si
<i>rrnD</i> P1	<0.25	Si
λ P _L	60	No
<i>LacUV5</i>	>600	No
<i>argI</i>	900	No
<i>hisG</i>	>800	No
<i>livJ</i>	400	No

1.2 Efecto en elongación. El ppGpp estimula las pausas durante la formación de RNAm (Krohn y Wagner, 1996) y reduce la velocidad de transcripción *in vitro* (Kingston *et al.*, 1981; Woody *et al.*, 1987; Furman *et al.*, 2012).

- Kingston *et al.*, (1981) mostraron que 200 μ M de ppGpp reduce la velocidad de elongación de 14 a 8 s⁻¹ (a partir de 10 min de reacción) en un DNA aleatorio, pero no en moldes poli[d(A-T)] y poli[dA-G]; además, el ppGpp no tiene efecto de inhibición competitiva con el sustrato (NTPs). Los autores proponen que el ppGpp introduce pausas tempranas de 10 s en operones *rrn*, esto genera una mayor separación entre RNAPs en elongación con la consiguiente reducción de la velocidad de transcripción.

- Woody *et al.*, (1987), así como Kingston *et al.*, (1981), reportaron la reducción de la liberación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ e incorporación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, durante la transcripción, en un 60% en presencia de 100 μM de ppGpp.
- Furman *et al.*, (2012), al igual que Woody *et al.*, (1987) y Kingston *et al.*, (1981), observaron una reducción de la velocidad de elongación del CTE (a partir del promotor T7A1) en un 50%: de 7 a 4.9 y 1.1 nt/s en la RNAP silvestre en presencia de 30 μM de ppGpp y ppGpp/DksA, respectivamente. Además, se reportó que la RNAP $\beta\Delta i6$ (inserción nativa en el TLH) tiene una velocidad de 13.2 nt/s y que el ppGpp y ppGpp/DksA la reducen a 7.9 y 0.32 nt/s, respectivamente. Este estudio nos muestra la importancia de la modulación del TLH por ppGpp. Además, tanto el ppGpp y DksA inhiben la reacción de pirofosforólisis (hidrólisis del nucleótido en 3'-RNA a nivel del sitio activo durante la elongación).
- Krohn y Wagner (1996) observaron que el ppGpp favorece las pausas durante la elongación de CTE a partir de promotores *rrnB* P1 y P2; principalmente a nivel de citosinas y uracilos (de 30% al 65%).
- Algunos autores, proponen la competencia del ppGpp con los NTPs a nivel de sitio activo y canal secundario de la RNAP de *E. coli* (Jöres y Wagner, 2003) y *T. thermophilus* (Artsimovitch *et al.*, 2004). Sin embargo, en la RNAP de *E. coli*, el ppGpp se une a 28 Å del sitio activo (Zuo *et al.*, 2013), (Ross *et al.*, 2013), (Mechold *et al.*, 2013).

III. HIPÓTESIS

El tetrafosfato de guanosina (ppGpp) regula la elongación de la transcripción realizada por la RNA polimerasa (RNAP) de *Escherichia coli* mediante la reducción de su velocidad libre de pausas.

IV. OBJETIVOS

1) Objetivos generales.

- Estudiar el efecto del ppGpp en la actividad del complejo ternario de elongación (CTE) de la RNA polimerasa (RNAP) de *Escherichia coli* a nivel de moléculas individuales.

2) Objetivos específicos.

- Caracterizar el efecto del ppGpp en la velocidad libre de pausas de la elongación del CTE de la RNAP de *E. coli*.
- Caracterizar el efecto del ppGpp en la cinética del *on-pathways* de la elongación del CTE de la RNAP de *E. coli*.
- Caracterizar el efecto del ppGpp en la cinética del *off-pathways* de la elongación del CTE de la RNAP de *E. coli*.
- Diseñar un modelo físico del mecanismo de acción del ppGpp en la actividad del CTE de la RNAP de *E. coli*.

V. MATERIALES

1) Plásmidos y cepas.

Los plásmidos pBGUAPA y pPIA2-6 fueron mantenidos en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con 10 – 15% glicerol en 1 ml y a -70°C. Ambas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS crecieron en medio Luria-Bertani (LB) (Merk) (1.5% agar) suplementado con ampicilina (Amp) a 10µg/ml para la purificación de los plásmidos y crecimiento en placa (1.5% agar)

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Material	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal</i> λ(DE3) [pLysS Camr]	Stratagene (La Jolia, CA)
pBGUAPA (8 067 pb)	Para la producción de <i>handle</i> . Amp ^r ,	Este estudio
pPIA2-6 (15 071 pb)	Para la producción de constructo. Contiene promotor λP _R , elemento UP y Amp ^r .	Este estudio

2) Reactivos químicos y equipos.

- Reactivos y equipos para DNA.

Bromuro de Etidio, Primer Forward PR_For_pinzas, Primer Reverse PR_Rev_pinzas, primer modificado Dig_handle_fw (IDT), Buffer PCR (Stratagene), Buffer TE, Gel Pilot loading dye 5X (Fermentas), Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb

DNA Ladder Plus), Agarosa (Cleaver Scientific Ltd), Enzima *Pfu*Turbo DNA polimerasa (Stratagene), Agua ultrapura, QIAquick PCR purification Kit (Qiagen), desoxinucleótidos (dNTPs) (Fermentas), BSA (New England BioLabs), Buffer 4 10X (New England BioLabs), Enzima de restricción *Apal*, *Aval*, *AseI* (New England BioLabs), Buffer T4 DNA Ligasa 10X, T4 DNA Ligasa (New England BioLabs), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) y Termociclador (AB Applied Biosystems).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para la generación de molécula para pinzas ópticas

Primers	%C+G	Secuencia	Tm (°C)	Referencia
PR_Rev_pinzas	47.4	5-ttatatgtgctttggcggc-3	52.8	Este estudio
PR_For_pinzas	45	5-taataaagctaacaggcccg-3	52.7	Este estudio
Dig_handle_fw	45	5-Dig-taataaagctaacaggcccg-3	52.7	Este estudio

- Reactivos y equipos para complejos de elongación.

RNA polimerasa biotinilada (Evgeny Nudler Ph.D., NYU Langone Medical Center, Department of Biochemistry), Heparina de sodio grado I-A (SIGMA-ALDRICH), bolitas de poliestireno de 2.05µm con antidigoxigenina y de 2.1µm con estreptavidina (Spherotech), Trisma® base (SIGMA), NaCl (Merk), MgCl₂ hexahidratado (Merk), Ditiotreitól (DTT) (ENZO® life sciences), nucleótidos trifosfatados (NTP) (Fermentas), dinucleótido ApU (Thermo scientific).

- Sistema de microfluidica.

Microcover glass rectangular N°2, 25 x 60 mm (1 x 23/8"); nescofilm con orificios hechos con láseres en los extremos; microcover glass rectangular anterior con orificios hechos con láseres, king precisión glass, 0.025 mm (ID) x 0.01 mm (OD) para dispensadores; king precision glass, 0.040 mm (ID) x 0.01 mm (OD) para micropipeta; tubo de polietileno P10, 0.28 mm (ID) x 0.64 mm (OD); Tubo de polietileno P50, 0.58 mm (ID) x 0.99 mm (OD), Jeringas de 1 ml, agujas y un soporte o holder para microcámara.

- Microscopía de pinzas ópticas.

El microscopio de Pinzas Ópticas tiene una resolución de fuerza en piconewton (hasta 150 pN), de distancia en nanómetros (nm) y temporal en milisegundos (ms). Trabaja con una longitud de onda de 845 nm. El instrumento de Pinzas Ópticas utiliza el *momentum* de la luz para capturar objetos de alto índice de refracción. La luz que incide sobre una partícula es refractada y reflejada. La luz que incide sobre la partícula genera un *momentum* (fuerza) sobre ella; donde según el ángulo de difracción, la partícula es empujada en dirección opuesta con la misma fuerza. Si la luz incide en el centro de la partícula, los ángulos de difracción se cancelan juntamente con las fuerzas, atrapando la partícula (Smith *et al.*, 2003), ver Figura 6.

La forma de medir la fuerza en una trampa óptica es considerar esta última como un pozo de potencial armónico o un resorte virtual que atrae a la partícula hacia el centro de la trampa. La fuerza es dada por:

$$F = k\Delta x \quad (1)$$

Donde Δx es el desplazamiento de la partícula en la trampa (nm) y k la constante del resorte (pN/nm). Esto es posible usando dos haces de luz de propagación opuesta

como se observa en la Figura 6. En esta disposición experimental, las fuerzas de dispersión generadas por los rayos reflejados son canceladas, mientras que las fuerzas transversales en gradiente son duplicadas (Smith *et al.*, 2003).

Figura 6. Diagrama de una trampa óptica. **A)** Haces duales de láseres que se propagan en contraposición. La partícula es atrapada en el foco de la luz, cuando las fuerzas dispersas formadas por los rayos reflejados son canceladas mientras las fuerzas en gradiente son dobladas. **B)** Sensor de la fuerza del *momentum* de la luz (Smith *et al.*, 2003).

Cuando una fuerza F (pN) es aplicada sobre la partícula atrapada, la partícula se mueve hacia ella hasta que la presión de la luz del haz deflectado exactamente balancea la fuerza externa. Si conos estrechos de luz son usados y la apertura detrás de los objetivos de la trampa de láseres está sin rellenar, todo el momento de la luz que deja la trampa puede ser colectado y dirigido a los fotodetectores sensibles de posición. Cuando se mide la distribución de intensidad angular de la luz del láser a la entrada y salida de la trampa es posible determinar el cambio en el flujo del *momentum* del haz de luz, lo que viene a ser estrictamente igual a la fuerza aplicada externamente sobre la partícula. De este modo, la fuerza es independiente del tamaño, forma e índice de refracción de la partícula (Smith *et al.*, 2003).

VI. METODOLOGÍA

1) Preparación de DNA para elongación en pinzas ópticas.

1.1 Preparación de plásmidos. Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLyss, que contienen los plásmidos pPIA2-6 y pBGUAPA se cultivaron en 10 ml de Luria-bertani (LB) con ampicilina (10 µg/ml), por 18 h, 37°C y 200 rpm. La extracción de plásmido se realizó con el Qiagen Miniprep Kit (Qiagen). La concentración del DNA se cuantificó en el Nanodrop y la pureza del DNA está dada por la relación A260/A280 (2) y A260/A230 (1.8 – 2.2).

1.2 Producción de *handle* a partir de pBGUAPA.

- **PCR a partir de pBGUAPA (8 067 pb).** Se utilizaron los primers PR_For_pinzas y Dig_handle_fw; el PR_Rev_pinzas fue usado como control positivo. Este PCR se realizó con la *Pfu*Turbo DNA polimerasa con un Ta de 49.2°C (Tabla 4). El producto esperado es de 1 100 pb.

Los productos de PCR para cada reacción fueron observados en electroforesis de agarosa 0.8%, 120 V, 1h y se cargaron 3 µl de cada reacción. Para todos los casos, se utilizó el marcador de peso Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados con el transluminador. El producto de PCR se purificó mediante el QIAquick PCR purification Kit, se cuantificó en el Nanodrop y se anotaron los valores de A260/A280 y A260/A230.

Tabla 4. Diseño del PCR para la obtención de la *handle* para construir la molécula de DNA para pinzas ópticas.

Reactivo	[] inicial	[] final	Control + (μl)	Handle (μl)
H2O	---	---	33	33
Buffer 10X <i>PfuTurbo</i>	10X	X	5	5
dNTPs	2 mM	0.2 mM	5	5
PR_For_pinzas	10 μM	0.5 μM	2.5	2.5
Dig_handle_fw	10 μM	0.5 μM	---	2.5
PR_Rev_pinzas	10 μM	0.5 μM	2.5	---
pBGUAPA	100 ng/μl	1 μl	1	1
<i>PfuTurbo</i> DNA pol	5 U/μl	1.25 U/50μl	1	1
Volumen final			50	50

Tabla 5. Termociclado del PCR para producir la *handle*

Número de ciclos	Temperatura	duración
1	95 °C	30 s
30	95 °C	10 s
	49.2 °C	30 s
	72 °C	1 min 15 s
	72 °C	10 min
1	4 °C	∞

- **Digestión del producto de PCR.** El producto de PCR (1 100 pb) fue cortado con la endonucleasa *ApaI* para su ligación al constructo de pPIA2-6. Los productos esperados son de 537 (*handle* con digoxigenina) y 563 pb. La incubación se realizó por 2 h a 25°C.

El producto de digestión fue visualizado en electroforesis de agarosa 0.8%, 120 V por 1 h. Para todos los casos, se utilizó el marcador de peso Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder Plus. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados con el transluminador. La *handle* (537 pb) fue purificada mediante el QIAquick PCR purification Kit, se cuantificó en el Nanodrop y se anotaron los valores de A260/A280 y A260/A230.

Tabla 6. Digestión del producto de PCR con *ApaI*

Reactivo	[] inicial	[] final	Vol (µl)
H2O	---	---	3
BSA	10 µg/µl	1 µg/µl	6
Buffer 4	10X	X	6
Producto PCR, 1100 pb	100 ng/µl	1 µl	43
<i>ApaI</i>	50 U/µl	100 U/50µl	2
Volumen final			60

1.3 Producción del constructo a partir de pPIA2-6.

- **Digestión del pPIA2-6 (15 071 pb).** El plásmido que contiene al promotor λP_R fue cortado de forma secuencial con las enzimas de restricción *AvaI* y *ApaI*. Los productos esperados son de 9 444 y 5 627 pb. Los productos de digestión para cada reacción enzimática fueron visualizados en electroforesis de agarosa de 0.8%, 100 V y por 1 h y 15

min. Para realizar el corte con *ApaI*, la enzima *AvaI* fue inactivada en la reacción previa a -20 °C luego de la incubación.

Para la primera reacción (37 °C por 2 h), el producto esperado fue de 15 071 pb y para la segunda (25 °C por 2 h y 30 min), 9444 y 5627 pb. El producto de 9.4 Kb fue purificado mediante el QIAquick Gel Extraction Kit, se cuantificó en el Nanodrop y se anotaron los valores de A260/A280 y A260/A230.

Tabla 7. Digestión del plásmido pPIA2-6 con *AvaI*

Reactivo	[] inicial	[] final	Vol (μl)
H2O	---	---	10.3
Buffer 4	10X	X	4.7
pPIA2-6	70 ng/μl	2.1 μg/50μl	30
<i>AvaI</i>	50 U/μl	100 U/50μl	2
Volumen final			47

Tabla 8. Digestión con *ApaI* del plásmido cortado con *AvaI*

Reactivo	[] inicial	[] final	Vol (μl)
H2O	---	---	3
BSA	10 μg/μl	1 μg/μl	6
Buffer 4	10X	X	6
pPIA- <i>AvaI</i>	2.1 μg/50μl	2.1 μg/60μl	42
<i>ApaI</i>	50 U/μl	100 U/50μl	3
Volumen final			60

1.4 Ligación de constructo y *handle*.

La *handle* de 537 pb y el constructo de 9 444 pb fueron ligados con la T4 DNA ligasa para producir la molécula de DNA (9 981 pb) para las pinzas ópticas. La concentración del constructo se ajustó a 640ng y la cantidad de *handle*, para ligar en la proporción molar 1:1, se determinó mediante la siguiente relación:

$$(\text{ng constructo} \times \text{pb } handle / \text{pb constructo}) \times (\text{moles } handle / \text{moles constructo}) = \text{ng de } handle$$

La reacción se incubó por 2 h y 30 min a 25°C. La enzima se inactivó a 65°C por 10 min culminada la incubación. El producto de ligación (9981) se visualizó (10µl) en electroforesis de agarosa 0.8%, 90 V por 2 h y 30 min, y se comparó con el constructo sin ligar (9 444 pb). Para todos los casos, se utilizó el marcador peso Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder Plus. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados con el transluminador.

Tabla 9. Reacción de ligación de la *handle* y pPIA2-6 cortado

Reactivo	[] inicial	[] final	Vol (µl)
H2O	---	---	2
ATP	10 mM	1 mM	6
Buffer T4 DNA ligasa	10X	X	6
<i>Apal</i> -pPIA- <i>Aval</i>	16 ng/µl	640 ng	40
<i>Handle</i> - <i>Apal</i>	12 ng/µl	36 ng	3
T4 DNA ligasa	400 U/µl	20 U/µl	3
Volumen final			60

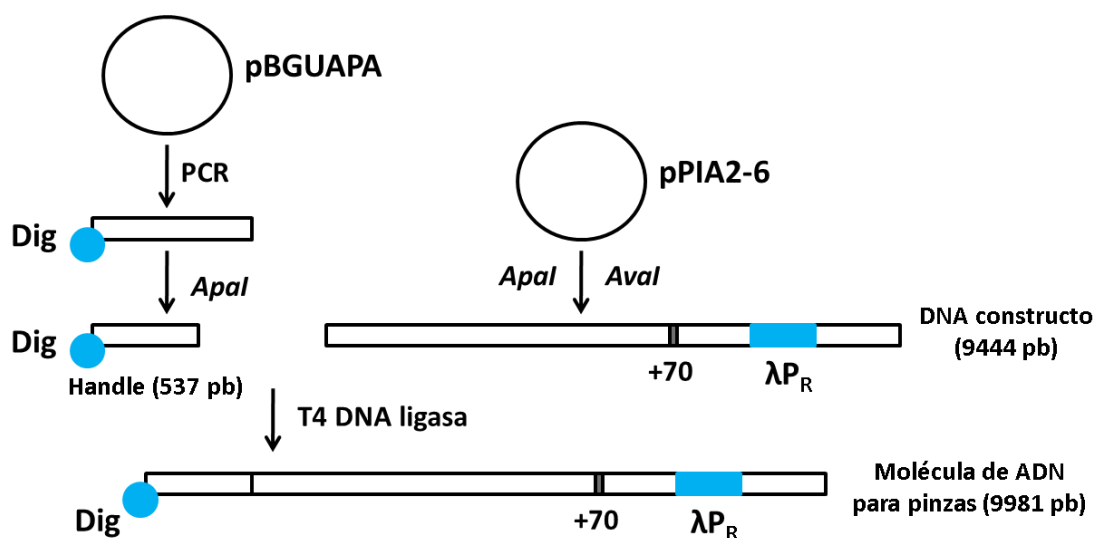


Figura 7. Esquema de formación de la molécula de DNA para las pinzas ópticas. Como se observa, esta se forma por dos vías. a) Elaboración de la *handle* por PCR y digestión con *AclI* a partir del plásmido pBGUAPA; y b) Producción del constructo, cortado con *AclI* y *AclI*, del DNA que tiene el promotor λP_R a partir del plásmido pPIA2-6. Además, se encuentra la posición +70 para formar los complejos detenidos o *stall complex* con la RNAP de *E. coli*.

2) Formación de complejos detenidos (“*stall*”) de RNAP para pinzas ópticas.

Se realizó en 3 pasos (Mejia *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2002), ver Figura 8:

1. Primero, se usó 1pmol (0.5 µg) RNAP biotinilada y 0.004pmol (27 ng) de DNA (9981 pb) (relación 250:1) en buffer de transcripción 1X (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 20 mM DTT, 10 mM MgCl₂); se incubó por 15 min a 37 °C en un volumen final de 5 µl. En este paso se forman los complejos de iniciación abiertos (RPO) entre la RNAP y el promotor λP_R.
2. Segundo, se adicionó 1.4 µl de la solución 5X *stall* (2.5 µM ATP, 2.5 µM GTP, 2.5 µM UTP y 150 µM ApU) y 1.4 µl de heparina 2 mg/ml; para llevar a una concentración final de 1X *stall* y 200 µg/ml de heparina. Se incubó a 25 °C por 15

min. En este paso, la RNAP escapa del promotor, elonga (sobre un región ausente en citosina, *C-less region*) y se detiene hasta la posición +70 (citocina); aquí se forman los complejos de elongación detenidos (*stall complex*) o CTE.

- Finalmente, la mitad de los complejos formados fueron incubados con bolitas de poliestireno (3.4 μm), que tienen anti-digoxigenina inmovilizada, y la endonucleasa *AseI* (10 U) en buffer de transcripción 1X; se incubó por 30 min a 25 °C. Los complejos formados fueron diluidos en 500 μl de buffer de transcripción 1X y mantenidos a 4 °C antes de su utilización en las pinzas ópticas. En esta etapa se separan las RNAP que se quedaron en el promotor λP_R y se unen los CTE a las bolitas de poliestireno.

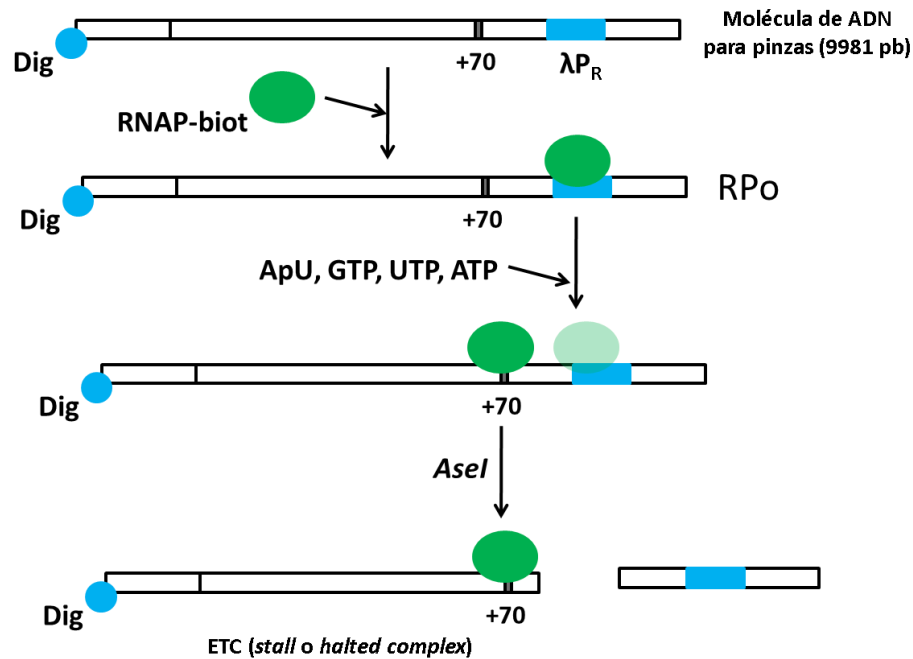


Figura 8. Esquema general de la formación de complejos de elongación para su uso en las pinzas ópticas. a) El DNA de 9981 pb se incubó con la RNAP de *E. coli* biotinilada para formar los complejos de iniciación (RPO) con el promotor λP_R ; b) La RNAP escapa del promotor, elonga y se detiene en la posición +70 (porción de DNA sin citosina, *C-less region*), formando así los complejos ternarios de elongación (CTE); c) los CTE son cortados con *AseI* para separar y excluir las RNAP retenidas en iniciación.

3) Diseño de microfluidica y geometría del experimento.

La cámara de microfluidos consta de dos capas externas de vidrio 24 mm x 60 mm x 0.2 mm, donde una de ellas contiene 6 agujeros hechos con láser. Estas láminas de vidrio encierran dos láminas de nescofilm (Figura 9A) entre las cuales se colocan la pipeta y los 3 dispensadores (Figura 9B). La pipeta se genera utilizando un sistema que, por medio de un aro caliente y la gravedad, agudiza la punta hasta lograr una luz de, aproximadamente 1 μm . En el canal principal de la Figura 9B (central), se realizan los experimentos de transcripción de acuerdo a la geometría de la Figura 10. Los dispensadores agregan, al canal central, bolitas con RNAP-DNA, con estreptavidina y NTPs. El sistema de microfluidos se completa colocando y asegurando las láminas ensambladas a una armazón de metal (Wuite *et al.*, 2000), ver Figura 9C y 9D.

Los complejos detenidos en +70 (RNAP y DNA), fueron capturados entre dos bolitas (esferas azules, Figura 10) que contienen anticuerpos contra la RNAP y DNA. El DNA tiene una digoxigenina (Dig) en un extremo (Figura 8) y este interacciona con un anticuerpo anti-Dig inmovilizado en una bolita de 3.4 μm . La RNAP tiene la subunidad β' biotinilada e interacciona con la estreptavidina inmovilizada en una bolita de 2.1 μm . La bolita unida al DNA es capturada por una laser (trampa óptica) y la bolita con RNAP, mediante presión negativa, por una pipeta (Mejia *et al.*, 2008; Davenport *et al.*, 2000; Wuite *et al.*, 2000; Forde *et al.*, 2002), ver Figura 10. La misma geometría se utilizó para los estudios con y sin ppGpp.

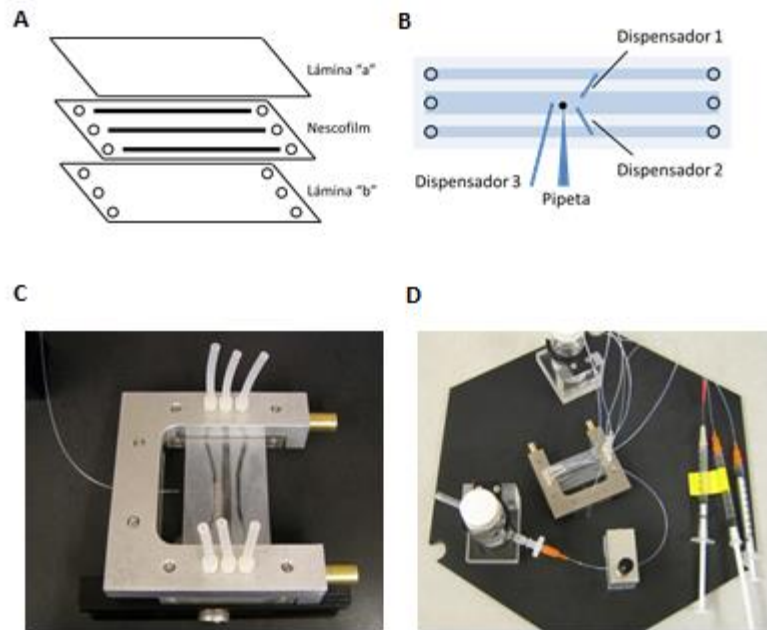


Figura 9. A) Imagen mostrando la forma de ensamblaje de la cámara de microfluidos. Las láminas a y b son de vidrio N°2, 25 x 60 mm (1 x 23/8"). El nescofilm tiene orificios y canales hechos con láser. Las láminas de vidrio sellan el nescofilm con la pipeta y dispensadores. **B)** Geometría de la disposición de pipeta y dispensadores. La micropipeta fija una bolita de poliestireno de 2.1 μm por presión negativa; mientras que los dispensadores 1, 2 y 3 adicionan, al canal central, bolita con anti-digoxigenina (2.1 μm), bolita con RNAP biotinilada en *stall complex* (2.04 μm) y NTPs para la reacción de transcripción, respectivamente. **C)** Armazón unido a las láminas ensambladas y con tubos de silicona, conectando los canales generados por el nescofilm, y **D)** Sistema completo de microfluidica, las jeringas contienen soluciones que son llevadas, mediante presión positiva, a los canales mostrados en B.

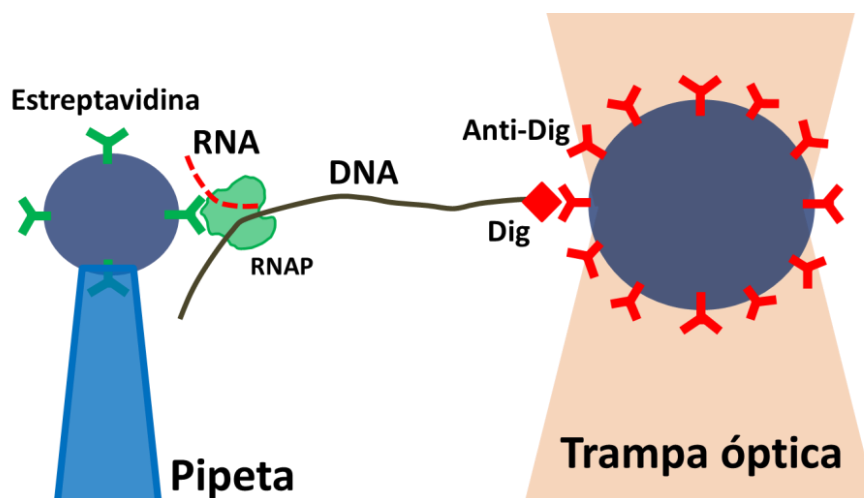


Figura 10. Geometría del experimento de los ensayos de transcripción (con y sin ppGpp) a 1 mM NTPs, 4 pN de fuerza y a 23 °C. La pipeta captura una bolita (2.1 μm) con estreptavidina (“anticuerpo” verde), por medio de presión negativa, y esta se une a la biotina de la RNAP-biotinilada (verde con RNA). La RNAP se encuentra en la posición +70 (*stall complex*) de los CTE. EL DNA modificado con digoxigenina (rombo rojo) se encuentra unido a una bolita de 2.1 μm y, este último, es capturado por una trampa óptica (rozado). Cuando se agregan los NTP, la RNAP “jala” al DNA y desplaza la bolita grande del centro de la trampa óptica. Mediante un sistema de *feed-back*, la trampa compensa el desplazamiento de la bolita y la longitud de DNA, sujetado entre ambas bolitas, se reduce en función del tiempo. De esta manera se puede obtener el desplazamiento por unidad de tiempo (velocidad de transcripción) de la RNAP en la elongación. Este experimento se realiza en el canal central de la figura 9B. La bolita con *stall complex* con adiconados al canal central por el dispensador 1; mientras que la bolita con estreptavidina, por el dispensador 2 (Figura 9B).

4) Obtención de datos y análisis.

Los datos fueron recogidos a 1 kHz y analizados con el programa progdnap v2p2 (Eric Galburt Ph.D., W.U. St. Louis; Yves Coello Ph.D., UC Berkeley) en MATLAB 7.8.0.347. Para minimizar el efecto del ruido, las trazas de actividad fueron tratadas con un filtro Savitzky-Golay de tercer orden y ancho de ventana de 250 datos (Hodges *et al.*, 2009; Neuman *et al.*, 2003; Mejia *et al.*, 2008). Las velocidades (nm/s) se calcularon tomando la derivada de la posición en función del tiempo ($v = dx/dt$) de la enzima a lo largo del molde de DNA. Para el cálculo de la velocidad libre de pausas, las pausas fueron eliminadas utilizando un umbral de velocidad o *dwel time* (tiempo de permanencia de la enzima en un nucleótido determinado) (Mejia *et al.*, 2008; Hodges *et al.*, 2009), ver Figura 11.

Las trazas de actividad fueron observadas visualmente para verificar que las pausas han sido correctamente marcadas (Hodges *et al.*, 2009). Una vez identificadas las pausas ($1 \text{ s} < \text{dwel time}$), la densidad de pausas se calculó dividiendo el número de

pausas sobre la longitud de DNA transcrito (# pausas/nm o nm^{-1}) (Mejia *et al.*, 2008). La conversión de nm/s a pb/s se utilizó la relación de 0.34 nm/pb. Para el cálculo de la densidad (pb^{-1}) y tiempo de pausas promedio (s), se utilizó el programa Microcal™ Origin® 6.0, y los valores se expresaron en media \pm desviación estándar (DE). La distribución de la velocidad libre de pausas se ajustó a una distribución normal, se determinó la velocidad libre de pausas media y la DE. Para el cálculo del error en constantes obtenidas de los modelos se utilizó la teoría de propagación de errores, mediante el programa en línea <http://laffers.net/blog/2010/11/15/error-propagation-calculator/>.

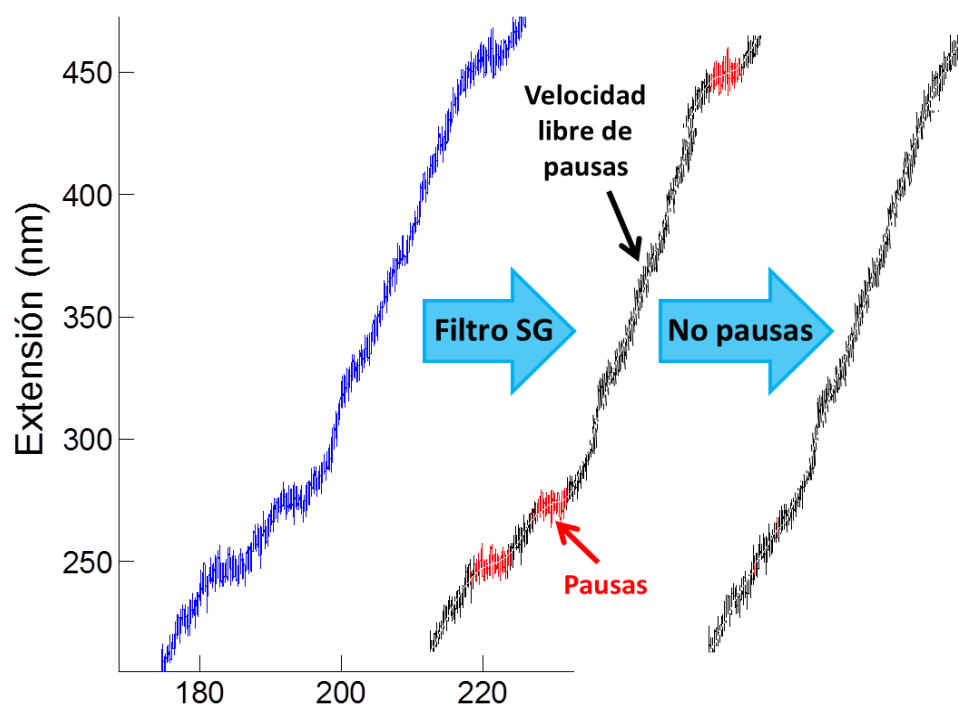


Figura 11. Ejemplo de una porción de trayectoria de transcripción de una RNAP individual (Traza). La traza de color azul representa los datos crudos. Cuando se realiza el filtro Savitzky-Golay (SG) (línea blanca continua), y mediante un umbral de *dwell time* (ver texto), se seleccionan las pausas (*off-pathway*) (rojo) y la elongación activa (*on-pathway*) (negro). Posteriormente las pausas son eliminadas y se calcula la velocidad libre de pausas de la RNAP. Las zonas rojas son seleccionadas para calcular la distribución, densidad y tiempo medio de pausas.

1.1 Densidad, distribución y media de tiempo de pausas.

Se determinó el tiempo de permanencia de la RNAP en cada posición a lo largo del molde de DNA (“*dwell time*”). Los tiempos de permanencia más cortos (*dwell time* <1 s) corresponden a lugares donde la RNAP transloca de forma activa; mientras que los largos (*dwell time* >1 s) son lugares de pausas, translocación neta inactiva de la RNAP (Mejia *et al.*, 2008). De acuerdo a lo anterior, las pausas pueden dividirse de la siguiente manera:

Tabla 10. Clasificación del tipo de pausa durante le elongación de la RNAP

Tipo	Tiempo (s)	Naturaleza	Referencia
Cortas	1 – 10	Difusiva	(Depken <i>et al.</i> , 2009; Hodges <i>et al.</i> , 2009; Galburt <i>et al.</i> , 2007; Maoiléidigh <i>et al.</i> , 2011)
	1 – 20		
Largas	20 <	Difusiva + Hidrólisis 3' RNAm	(Shaevitz <i>et al.</i> , 2003; Maoiléidigh <i>et al.</i> , 2011)

La distribución de frecuencia del tiempo de pausas cortas (t, s) fue ajustada a la ley potencial de $t^{-3/2}$ (Galburt *et al.*, 2007):

$$N(t) = \frac{t^{-3/2}}{\sqrt{4\pi D}} \quad (2)$$

Si las pausas se ajustan correctamente, estas tienen un origen difusivo. Además se puede calcular la constante de difusión.

También, el tiempo de pausas se ajustó a la distribución de probabilidad acumulada mediante la siguiente ecuación (Zamft *et al.*, 2012; Hodges *et al.*, 2009):

$$\Psi(t) = \frac{\int_1^t \psi(t)dt}{\int_{t_{min}}^{t_{max}} \psi(t)dt} \quad (3)$$

Donde t_{max} y t_{min} son los tiempos de pausas extremos (máximo y mínimo, respectivamente) de los datos de pausas (s); y $\psi(t)$ es la distribución del tiempo de pausas en función de constantes de velocidad (k_f y k_b) en pausas bajo una fuerza F (pN) y está definido por (Zamft *et al.*, 2012; Hodges *et al.*, 2009):

$$\psi(t) = \sqrt{\frac{k_f}{k_b}} \frac{e^{-(k_f+k_b)t}}{t} I_1 \left(2t \sqrt{k_f k_b} \right) \quad (4)$$

Donde k_f y k_b son las constantes de velocidad de movimiento hacia adelante (*forward*) y hacia atrás (*backtrack*) (s^{-1}) bajo una fuerza F (pN), respectivamente, en pausas; y I_1 es la función bessel de primer orden. Estas constantes se relacionan con la fuerza aplicada (F , pN) sobre la RNAP de la siguiente ecuación (Zamft *et al.*, 2012; Hodges *et al.*, 2009):

$$k_f = k_0 e^{Fd/K_B T}; \quad k_b = k_0 e^{-Fd + \Delta G_{ARN}/K_B T} \quad (5)$$

$$k_0 = A e^{-\varepsilon/K_B T} \quad (6)$$

Donde k_0 es la constante de velocidad en pausas a 0 pN de fuerza (s^{-1}) y d es la distancia al estado de transición (0.5 pb para la RNAP); y ΔG_{RNA} es la contribución energética ($K_B T$) del RNAm naciente al movimiento hacia atrás (*backtrack*), de la RNAP en difusión, durante la elongación (Zamft *et al.*, 2012). A partir de la distribución acumulada $\psi(t)$ (ecuación 4), se obtuvo k_0 . El correcto ajuste de la distribución de pausas a la ecuación 3 indica, también (al igual que a la ecuación 2), que las pausas tienen un

origen difusivo. ε es la energía de activación en pausas ($K_B T$) y “A” es el factor pre-exponencial de la ecuación de arhenius (s^{-1}), ver ecuación 6.

Para determinar ΔG_{RNA} en función del porcentaje de citosina y guanina (%C+G) se basó en la relación que se indica en la Figura 12 (Zamft *et al.*, 2012):

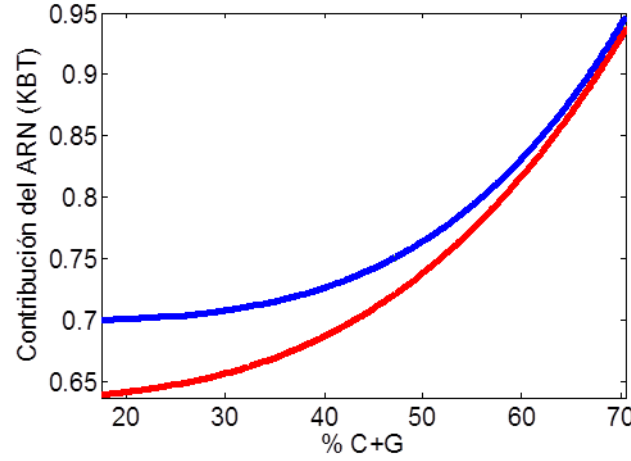


Figura 12. Relación del %C+G y la contribución energética del RNAm naciente (ΔG_{RNA}) al movimiento hacia atrás de la RNAP, durante la difusión. La curva roja ($\Delta G_{RNA} = 4.69 \times 10^{-7} (\%C+G)^{3.14} + 0.64$) y azul ($\Delta G_{RNA} = 1.60 \times 10^{-8} (\%C+G)^{3.89} + 0.70$) es para la RNAP mitocondrial y RNAP II nuclear (Pol II) de *S. cerevisiae*, respectivamente. El %C+G en nuestro DNA molde es de 57 %, por lo tanto corresponde un $\Delta G_{RNA} \sim 0.8 K_B T$.

Se estimó de forma teórica la densidad de pausas (P_d , #pausas/Kb o Kb^{-1}) mediante la siguiente ecuación (Zamft *et al.*, 2012; Hodges *et al.*, 2009):

$$P_d(t_{min} < t < t_{max}) = \frac{k_p}{k_e + k_p} \int_{t_{min}}^{t_{max}} \psi(t) dt \quad (7)$$

Donde k_p es la constante de ingreso a pausas (s^{-1}) y es semejante a k_b (s^{-1}) ($k_p \sim k_{b1}$), k_e es la constante de ingreso a elongación (nt/s) (Mejia *et al.*, 2008) y $\psi(t)$ está definida por la ecuación 4.

VII. MODELOS DE LA TRANSCRIPCIÓN

En esta sección se proponen esquemas y deducen ecuaciones que describen la elongación con el objetivo de definir el efecto del ppGpp durante la polimerización activa (*on-pathway*) y durante la difusión en pausas (*off-pathway*). Los alcances del modelo son los siguientes:

1. Es posible calcular, por primera vez, la energía de activación en pausas.
2. Se extrae el número de estados del *on-pathway* de forma sistemática.
3. Se puede determinar que reacciones dentro del *on-pathway* son dependiente del sustrato, fuerza y producto.
4. Se puede determinar que reacciones son reversible o irreversibles.
5. Es posible extraer, a partir de la distribución del *dwell time*, la constante catalítica.
6. Se puede determinar la ecuación de velocidad, el K_M y el V_{max} .

Debido a la generalidad de las ecuaciones, estas pueden usarse para cualquier reacción enzimática; esto incluye a los motores moleculares (Kinesina, Miosina V, Ribosoma, DNA polimerasa, DNA helicasa, T4 DNA exonucleasa, etc.) en ausencia o presencia de diferentes reguladores de su actividad.

1) Difusión en pausas.

El mecanismo cinético de la RNAP en elongación sigue el esquema de la Figura 13 (Hodges *et al.*, 2009). En él se observa que la elongación es irreversible mientras que el ingreso y la difusión en pausas son reversibles, inducidos térmicamente (Mejia *et al.*, 2008). En pausas, la RNAP difunde más de 1-5 pb, ingresa al estado de reparación de errores - pausas largas (en presencia de pirofosfato) o arresto (Shaevitz *et al.*, 2003).

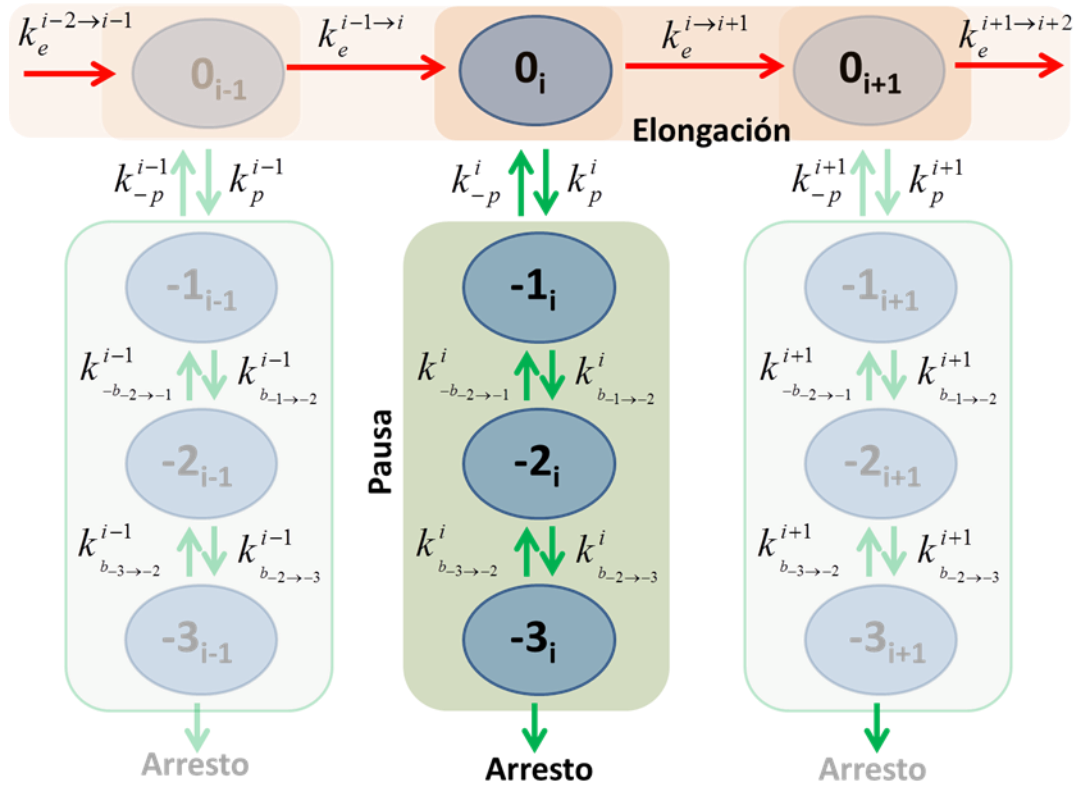


Figura 13. Esquema cinético del mecanismo de elongación de la RNAP en la transcripción. El mecanismo es representado por los estados (índices: 0, -1, -2, -3, etc. con un RNAm de i -nucleótidos) y subestados (subíndice, extensión del RNAm: $i-1$, i , $i+1$, etc.): Por ejemplo, una formación de un RNA con i -nucleótidos crece hasta $i+1$ -nucleótidos ($i \rightarrow i+1$) en estado de elongación 0. Sin embargo, las pausas y arreso abarcan los estados -1, -2, -3 y -4, -5, respectivamente en un mismo subestado de elongación (i por ejemplo). Como se menciona en el texto, cada constante (velocidad en elongación, entrada o salida de pausas y difusión en pausas) dependen de la secuencia (i -dependencia) de DNA. En pausas se observa que la RNAP difunde por los estados -1, -2, -3 conducido por la energía térmica del medio de forma reversible, al igual que la entrada o salida de pausas. Sin embargo, la elongación es aproximadamente irreversible a la energía térmica del medio ya que, para pasar del subestado $i \rightarrow i+1$, es necesaria la liberación de energía química de la ruptura del γ -fosfato de los NTPs. La energía térmica del medio es necesaria pero no suficiente en elongación, ésta requiere de energía química (más de $20 K_B T$).

En la Figura 14 se muestra la representación energética del mecanismo cinético de la Figura 13. En elongación, la RNAP pasa del subestado $i \rightarrow i+1$ con una constante de velocidad (k_e) dependiente de la energía de activación ΔG_e^+ ; mientras tanto, la constante de velocidad para entrar a pausas (K_p) depende de ΔG_p^+ . En pausas existen múltiples energía de activación por cada paso *forward* ($\Delta G_{f-1 \rightarrow -2}^+, \Delta G_{f-2 \rightarrow -3}^+, \dots \approx \varepsilon$) o de *backtracking* ($\Delta G_{b-1 \rightarrow -2}^+, \Delta G_{b-2 \rightarrow -3}^+, \dots \approx \varepsilon$) dependiente de secuencia, los cuales son superados por la RNAP gracias a la energía térmica del medio ($K_B T$).

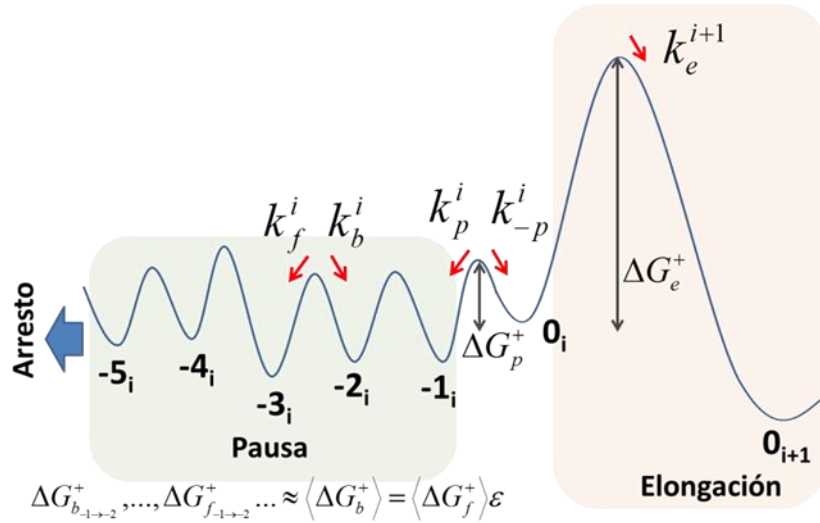


Figura 14. Se representa el valle de energía de ingreso a elongación, pausas y difusión en pausas. La región de color rosa muestra el proceso elongación activa ($i \rightarrow i+1$) en el estado 0 (posición de referencia para los movimientos *forward* y de *backtracking*), los cuales son separados por una energía de activación (ΔG_e^+). Debido a que la energía de activación para entrar a pausas (ΔG_p^+) es mucho menor que la de elongación (1.29 ± 0.05 frente a 9.7 ± 0.7 kcal/mol, respectivamente), y se encuentra en el rango de la energía térmica del medio ($K_B T$); la RNAP es propensa a realizar pausas. En pausas, la RNAP difunde entre los estados -1, -2, etc., debido a que la energía de activación media (ε), puede ser superada por la energía térmica del medio ($K_B T$).

En pausas, se observa que la RNAP difunde entre los estados -1, -2, -1, etc. (Figura 8), los cuales son el retroceso o avance de la RNAP sobre el híbrido RNA-DNA ya formado. Por lo tanto, la distribución de desplazamientos de la RNAP en pausas se encuentra regida por una función de densidad normal (ecuación 8) y la media de los desplazamientos al cuadrado se relaciona con la ecuación de Einstein –Smoluchowski en 1 dimensión (ecuación 9):

$$F(x) = \frac{1}{\sqrt{4\pi\sigma}} e^{-\left(\frac{x}{\sigma}\right)^2} \quad (8)$$

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (9)$$

Donde $F(x)$ es la función de densidad de la distribución del desplazamiento de la RNAP en pausas, x es el desplazamiento (nm), σ es la desviación estándar de la distribución, D es la constante de difusión de la RNAP en pausas (nm²/s) y t es el tiempo de difusión (s). La varianza $\sigma^2 = \langle x^2 \rangle + \langle x \rangle^2$ puede ser simplificada a $\sigma^2 = \langle x^2 \rangle$ ($\langle x \rangle^2 = 0$ en movimiento aleatorio), por lo tanto: $\sigma^2 = 2Dt$. Reemplazando en la función de distribución normal podemos obtener la ecuación de Green ($F(x, t) = (1/\sqrt{4\pi Dt})e^{-(x^2/4Dt)}$) y derivar la relación potencial de la distribución de tiempo de pausas (Galburt *et al.*, 2007):

$$N(t) = \frac{t^{-3/2}}{\sqrt{4\pi D}} \quad (10)$$

Esta relación ha sido demostrada experimentalmente (Mejia *et al.*, 2008; Galburt *et al.*, 2007), lo cual indica que las pausas son generadas por mecanismo difusivos, o inducidos térmicamente por el medio.

La constante de difusión (rotacional + lineal) de proteínas que difunden en 1D sobre el DNA y siguen su helicidad puede ser calculada mediante la siguiente relación (Bagchi *et al.*, 2008; Blainey *et al.*, 2009):

$$D_{slide}^{helix} = b^2 \frac{K_B T}{(6\pi n R b^2 + 8\pi n R^3 + 6\pi n R R_{OC}^2)} F(\epsilon) \quad (11)$$

$$F(\epsilon) = e^{-(\epsilon/K_B T)^2} \quad (12)$$

Donde b es 3.4nm (DNA), n es la constante de viscosidad del medio, R es el radio de la proteína (nm), R_{OC} es la distancia del centro de masa de la proteína hacia el centro de la hélice del DNA (nm) y $F(\epsilon)$ es la distribución de la energía de activación media de la difusión de la proteína (nm) y ϵ es la energía media de activación (Zwanzig, 1988). Estas relaciones de difusión no son ajenas a la difusión de la RNAP en pausas (Figura 13 y 14). La RNAP difunde sobre un híbrido de RNA-DNA, dwDNA y upDNA. Podemos observar que la ecuación 11 se relaciona con la ecuación de Einstein:

$$\zeta_{total} D_{slide}^{Helix} = K_B T \quad (13)$$

Donde el coeficiente de fricción ζ_{total} (pN.s/nm) se define como:

$$\zeta_{lineal} + \zeta_{rotacional} = \zeta_{total} = \left(6\pi n R + \frac{8\pi n R^3}{b^2} + \frac{6\pi n R R_{OC}^2}{b^2} \right) / F(\epsilon) \quad (14)$$

Donde D_{slide}^{helix} es la constante de difusión (nm²/s), K_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta (K). A 30 °C, $K_B T = 4.2$ pN.nm. Para el caso de la RNAP, ζ_{total} es el coeficiente de fricción en pausas, $F(\epsilon)$ es la distribución de la energía de activación media en pausas y D_{slide}^{helix} es la constante de difusión en pausas (nm²/s), la cual es idéntica a la constante D de la ecuación 10 ($N(t) = t^{-3/2}/\sqrt{4\pi D}$). Ambas constantes son idénticas ya que las dos ecuaciones independientes son derivadas a partir de dos

relaciones con la misma constante de difusión: $\zeta \cdot D = KT$ y $\langle x^2 \rangle = 2Dt$. Finalmente, podemos afirmar:

$$D = D_{slide}^{Helix} \quad (15)$$

Por lo tanto, si reemplazamos la constante D de la ley potencial ($t^{-3/2}$) (ecuación 10) por la relación que contiene el $F(\varepsilon)$ (ecuación 11), podemos derivar una relación para obtener, a partir de la distribución de tiempo de pausas, la energía de activación media de la difusión en pausas:

$$N(t) = \frac{t^{-3/2}}{\sqrt{Ae^{-(\varepsilon/K_B T)^2}}} \quad (16)$$

Donde t es el tiempo de pausas (s), $N(t)$ la función de distribución del tiempo de pausas, A es una constante la cual es igual a $4\pi b^2(KT/6\pi nRb^2 + 8\pi nR^3 + 6\pi nRR_{OC}^2)$ y ε es la energía de activación media en pausas ($K_B T$). De esta última relación podemos observar que, graficando la distribución de la frecuencia del tiempo de pausas, podemos obtener la energía de activación media ($\varepsilon \approx \langle \Delta G_b^+ \rangle \approx \Delta G_b^+ \approx \Delta G_{-b}^+$), ver Figura 14. De la ecuación 10 y 16 podemos relacionar lo siguiente: Cuando la energía de activación media en pausas disminuye ($\varepsilon^{ppGpp} < \varepsilon$), la constante de difusión aumenta ($D^{ppGpp} > D$) y el tiempo de pausas disminuye ($\langle t \rangle_{ppGpp} < \langle t \rangle$). Pero, cuando se genera una disminución de la constante de difusión ($D^{ppGpp} < D$) se produce el aumento del tiempo de pausas ($\langle t \rangle_{ppGpp} > \langle t \rangle$).

2) Cinética básica del *on-pathways*.

Hasta la fecha, se han propuesto numerosos mecanismos en la cinética básica de la RNAP (Mejia *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2007; Dangkulwanich *et al.*, 2013; Abbondanzieri *et al.*, 2006). A pesar de las diferencias, ninguno de estos estudios

extrae el mecanismo básico de forma sistemática. En esta sección, se propone un modelo general para extraer el mecanismo básico enzimático del *on-pathways* y cálculo de constantes.

El único supuesto para el modelo es el siguiente: las propiedades de los estados del mecanismo enzimático son independiente del estado predecesor, es decir la enzima “no tiene memoria” (“*memory-less*”) del estado origen (proceso Markov) (Moffitt *et al.*, 2010). A nivel molecular, una reacción se conforma por dos estados separados por una energía de activación mayor a la energía térmica del medio ($1 K_B T <$) (Wunderlich *et al.*, 2013) y cada estado tiene subestados separados por una energía de activación menor a la energía térmica del medio ($< 1 K_B T$) (Nettels *et al.*, 2007). La escala de tiempo de la velocidad entre estados es de mseg o seg; mientras que entre subestados, de μ seg o nseg (Moffitt *et al.*, 2010; Nettels *et al.*, 2007). Notamos que cada estado es en realidad una colección de subestados y, estos últimos, son de naturaleza difusiva. Por lo tanto, las fluctuaciones entre los subestados borran completamente la memoria del estado predecesor. En este escenario, la probabilidad de cambio del estado depende únicamente del potencial local energético (control, cinético y termodinámico) más no del potencial predecesor; en cumplimiento con la distribución de Boltzmann. De lo mencionado, la estructura estadística de los procesos molecular se reduce a la propiedad markoviana (demostrado en el ANEXO 3, Pag. 111). El principio básico de un proceso Markov es que la probabilidad de $A \rightarrow B$ no depende de la “historia” de la reacción.

La función de distribución de probabilidad ($\psi(t)$) del proceso $1 \rightarrow 2$, con constante de velocidad k_x (s^{-1}), es la siguiente (Zhou, 2010):

$$\psi(\tau)_{1 \rightarrow 2} = k_x e^{-k_x \tau} \quad (17)$$

Donde τ (seg) es el tiempo total de la reacción $1 \rightarrow 2$. Por lo tanto el tiempo medio de la reacción $\langle \tau \rangle$ es:

$$\langle \tau \rangle = \int_0^{+\infty} \tau \psi(\tau)_{1 \rightarrow 2} d\tau = \frac{1}{k_x} \quad (18)$$

De acuerdo a la teoría markoviana, la distribución temporal de dos procesos acoplados sigue la ecuación de Chapman-kolmogorov: $P(s+t)_{in} = \sum_v P(s)_{iv} P(t)_{vn}$, donde $P(s+t)_{in}$ es la probabilidad temporal de ir desde el estado $i \rightarrow n$ que abarca un tiempo $s+t$, y $P(s)_{iv}$ y $P(t)_{vn}$ es la probabilidad temporal de ir desde $i \rightarrow v$ y $v \rightarrow n$ en un tiempo s y t ; para variables continuas tenemos $p(s+t)_{in} = \int_0^{s+t} p(s)_{iv} \psi(t)_{vn} ds$ (Feller, 1997). Por lo tanto para dos procesos Markov consecutivos ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$) la distribución temporal es la siguiente (Floyd *et al.*, 2010):

$$\psi(\tau)_{1 \rightarrow 3} = \int_0^\tau \psi(t)_{1 \rightarrow 2} \psi(\tau-t)_{2 \rightarrow 3} dt \quad (19)$$

Donde la reacción $1 \rightarrow 2$ ocurre en el tiempo t con una constante de velocidad k_x ; mientras que $2 \rightarrow 3$, en el tiempo $\tau-t$ con una constante k_y . Cada proceso tiene una distribución $\psi(t)_{1 \rightarrow 2} = k_x e^{-k_x t}$ y $\psi(\tau-t)_{2 \rightarrow 3} = k_y e^{-k_y(\tau-t)}$. Reemplazando en 19, se obtiene lo siguiente (Floyd *et al.*, 2010; Feller, 1997):

$$\psi(\tau)_{1 \rightarrow 3} = \frac{k_x k_y}{k_x - k_y} [e^{-k_y \tau} - e^{-k_x \tau}] \quad (20)$$

Debido a que cada proceso es independiente (propiedad markoviana), se cumple que la esperanza matemática de un proceso global equivale a la esperanza matemática de los procesos individuales es decir $\langle A + B + \dots \rangle = \langle A \rangle + \langle B \rangle + \dots$. Para nuestro caso $\langle \tau_{1 \rightarrow 2} + \tau_{2 \rightarrow 3} + \dots + \tau_{n-1 \rightarrow n} \rangle = \langle \tau \rangle_{1 \rightarrow 2} + \langle \tau \rangle_{2 \rightarrow 3} + \dots + \langle \tau \rangle_{n-1 \rightarrow n}$. Por lo tanto, el tiempo medio de reacción el cual incluye tres estados es:

$$\langle \tau \rangle_{1 \rightarrow 3} = \frac{1}{k_x} + \frac{1}{k_y} \quad (21)$$

Además, usando $\langle \tau \rangle_{1 \rightarrow 3} = \frac{k_x k_y}{k_x - k_y} \int_0^{+\infty} \tau [e^{-k_y \tau} - e^{-k_x \tau}] d\tau$ se puede llegar a la misma relación. Para una reacción de 4 estados ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4$), con constantes de velocidad k_x , k_y y k_z , respectivamente y tiempos de reacción a , $t - a$ y $\tau - t$, la función de distribución es:

$$\psi(\tau)_{1 \rightarrow 4} = \int_0^\tau \int_0^t \psi(a)_{1 \rightarrow 2} \psi(t - a)_{2 \rightarrow 3} \psi(\tau - t)_{3 \rightarrow 4} dt da \quad (22)$$

De la misma manera que para 19, la ecuación 22 se expresa:

$$\psi(\tau)_{1 \rightarrow 4} = \frac{k_x k_y k_z}{(k_x - k_y)(k_z - k_y)} [e^{-k_y \tau} - e^{-k_z \tau}] - \frac{k_x k_y k_z}{(k_x - k_y)(k_z - k_x)} [e^{-k_x \tau} - e^{-k_z \tau}] \quad (23)$$

Como se observa, las ecuaciones pueden extenderse a más procesos. Sin embargo, solo presentaremos hasta un proceso de 4 estados ya que tiene un fin práctico para el mecanismo enzimático de la RNAP (ver resultados). La ecuación 23 aparenta ser compleja, pero no lo es, ya que solo depende de 3 parámetros: k_x , k_y y k_z . Al igual que para los procesos de 2 o 3 estados, el tiempo medio de reacción es:

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{k_x} + \frac{1}{k_y} + \frac{1}{k_z} \quad (24)$$

Hasta el momento, se ha introducido a τ (s) como el tiempo de reacción global. Pero ¿Qué representa τ en el mecanismo enzimático? y ¿es determinable experimentalmente?. Como se mencionó, τ es el tiempo global de reacción y de naturaleza fluctuante. Esta magnitud es el *dwell time* de la enzima. El *dwell time* es el tiempo de permanencia de la enzima sobre una posición. Por lo tanto si el conjunto de los *dwell time* contiene la información del tiempo de reacción, la distribución de los *dwell time*

del *on-pathway* es la función de distribución $\psi(\tau)$ descrita en las ecuaciones 17, 20 o 23. Para el caso de la RNAP, los cortos *dwell times* (<1s) corresponden a lugares donde la RNAP transloca de forma activa (Mejia *et al.*, 2008). Finalmente, ajustando la distribución de los *dwell times* cortos a las ecuaciones 17, 20 o 23, nos mostrará si la RNAP, en el *on-pathway*, consiste en 2, 3 o 4 estados.

De la siguiente relación (Chemla *et al.*, 2008):

$$v\langle\tau\rangle = \langle d \rangle \quad (25)$$

Donde v es la velocidad de la enzima (nm/s) y determinable experimentalmente; $\langle\tau\rangle$ es el tiempo medio del *dwell time* (s) del *on-pathway* y $\langle d \rangle$ es la distancia física entre pasos (nm). Reemplazando $\langle\tau\rangle$ por la suma de las inversas de las constantes de velocidad (ecuación 18, 21 y 24), se puede obtener $\langle d \rangle$. Por ejemplo, para los mecanismos de 2, 3 y 4 estados, respectivamente:

$$v\left(\frac{1}{k_x}\right) = \langle d \rangle \quad (26)$$

$$v\left(\frac{1}{k_x} + \frac{1}{k_y}\right) = \langle d \rangle \quad (27)$$

$$v\left(\frac{1}{k_x} + \frac{1}{k_y} + \frac{1}{k_z}\right) = \langle d \rangle \quad (28)$$

También, hemos definidos las constantes de velocidad (k_x, k_y y k_z), pero ¿Qué representan estas constantes de velocidad?, ¿son determinables experimentalmente?. Estas son constantes de velocidad irreversibles; sin embargo, a nivel enzimático, existen procesos reversibles acoplados a irreversibles. En 1975, Cleland propuso que todo mecanismo enzimático puede ser definido por “constantes de velocidad efectivas” (k_{eff}) las cuales son irreversibles. Por ejemplo, para el mecanismo de la Figura 15A, donde A,

B, C y D representan los estados de la reacción global $A \rightarrow D$. De acuerdo a Cleland, la reacción puede reescribirse como se muestra en la figura 15B, donde k_m , k_n y k_p son las constantes efectivas (s^{-1}) de velocidad de cada paso de la reacción (Cleland, 1975). Estas se relacionan con las constantes verdaderas de la siguiente manera:

$$k_p = k_3 \quad (29)$$

$$k_n = \frac{k_2[S]k_3}{k_3 + k_{-2}[P]} \quad (30)$$

$$k_m = \frac{k_1k_2[S]k_3}{k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2}[P] + k_2[S]k_3} \quad (31)$$

A partir de la Figura 15B notamos que el “mecanismo cleland” tiene la forma del mecanismo Markov para 4 estados y, por lo tanto, la distribución del tiempo de reacción es $\psi(t)_{A \rightarrow D}$. De esta manera, podemos afirmar que se cumple la ecuación 23 y que $k_x = k_m$, $k_y = k_n$ y $k_z = k_p$.

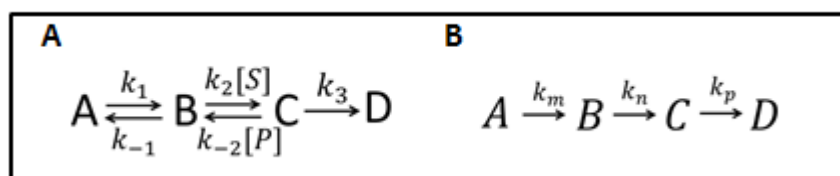


Figura 15: Ejemplo de un mecanismo enzimático que consiste en 4 estados. **A)** Mecanismo enzimático original que se compone de dos reacciones reversibles y una última irreversible; **B)** Mecanismo enzimático de A según cleland, donde todas las constes son constes de velocidad efectivas.

Modificando la fuerza aplicada sobre la enzima, la concentración de sustrato (NTPs para nuestro caso) y ajustando la distribución de los *dwell time* a las ecuaciones 27, 30 y 33, se podrá identificar cuáles constantes de velocidad son dependientes de fuerza, concentración de sustratos y producto. Además, reemplazando las ecuaciones 29 – 31 en 28 (correspondientes al mecanismo de la Figura 15B) y suponiendo que k_2 es dependiente de la concentración de sustrato ($[N]$), se obtiene lo siguiente:

$$v \left(\frac{k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2}[P] + k_2[S]k_3}{k_1k_2[S]k_3} + \frac{k_3 + k_{-2}[P]}{k_2[S]k_3} + \frac{1}{k_3} \right) = \langle d \rangle \quad (32)$$

Reordenando, la ecuación 32 se reduce a:

$$v = \frac{\frac{k_1k_3}{(k_1 + k_3)}[S]}{\frac{(k_{-1} + k_1)(k_3 + k_{-2}[P])}{k_2(k_1 + k_3)} + [S]} \langle d \rangle \quad (33)$$

Se observa que la ecuación tiene la forma: $v = \frac{V_{max}[N]}{K_m + [N]}$. Por lo tanto: $V_{max} = \frac{k_1k_3}{(k_1 + k_3)} \langle d \rangle$ y $K_m = \frac{(k_{-1} + k_1)(k_3 + k_{-2}[P])}{k_2(k_1 + k_3)}$. Las constantes V_{max} y K_m depende de muchas constantes de velocidad. Sin embargo, hay un parámetro que se puede extraer sin mucha complicación: $k_{cat} = k_3$. El k_{cat} se extrae directamente ya que es igual a la constante efectiva k_z (ecuación 29); y este último se extrae de la distribución del *dwell time* (ecuación 23). En el ANEXO 2 (pag. 109) se muestran las ecuaciones para diferentes modelos.

3) Efecto de ppGpp en la competencia cinética entre el *on-pathway* y el ingreso a pausas.

Suponiendo que el ppGpp mantiene la naturaleza difusiva de las pausas, el mecanismo puede explicarse con el modelo energético previo (Neuman *et al.*, 2003),

(Mejia *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011; Zamft *et al.*, 2012), donde la constante velocidad del *on-pathway* (k_e) y de ingreso a pausas (k_p) (o *first backtracking* [k_{b1}]) están controlados por una energía de activación para cada proceso, ΔG_e^+ y ΔG_p^+ (Mejia *et al.*, 2008) respectivamente, y ambos se consideran procesos Arrhenius. El ppGpp podría inducir i) Cambio en el diagrama de energía: disminución de ΔG_e^+ y ΔG_p^+ en $\Delta\Delta G_{ii}^+$ y $\Delta\Delta G_{i}^+$, respectivamente (Figura 16) o ii) Cambio en el factor pre-exponencial de cada proceso: de A_{e_0} y A a $A_{e_0}^{ppGpp}$ y A^{ppGpp} , respectivamente. El supuesto para ambos caso es que la distancia hacia el estado de transición no ha sido alterada. También podemos considerar el efecto de las estructuras del RNA (ΔG_{RNA}) en la constante k_p (Zamft *et al.*, 2012). El factor pre-exponencial “A” de las pausas (ecuación 6) es igual al proceso del ingreso a pausas ya que ambos son de la misma naturaleza: difusiva (Dangkulwanich *et al.*, 2013), ver Figura 1.

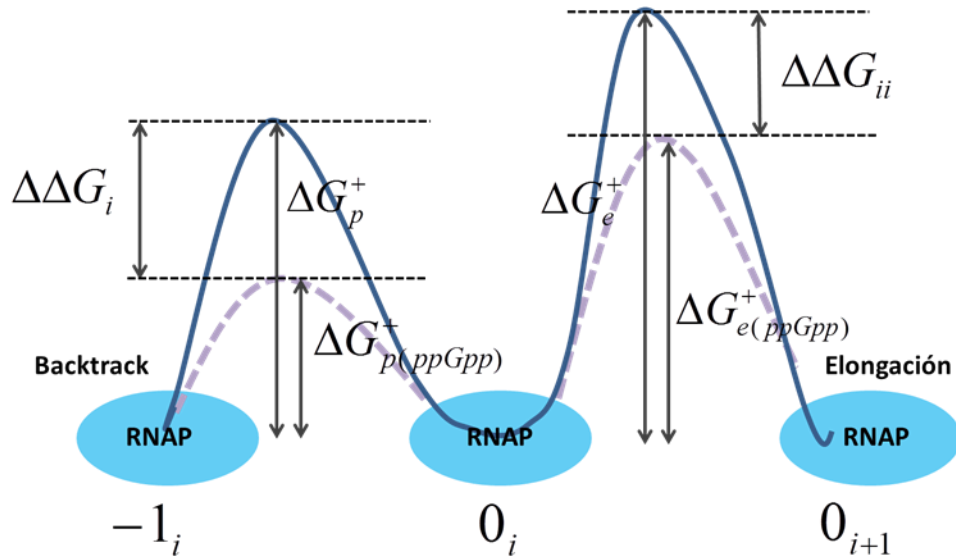


Figura 16. Diagrama de energía libre de la RNAP donde el sitio activo se encuentra posicionado sobre el extremo 3' del RNA en el híbrido RNA-DNA con un RNAm de i -nucleótidos (0_i), *backtracking* de 1pb sin crecimiento del RNAm (-1_i), y del *on-pathway* del RNAm de i -nucleótidos a $i+1$ -nucleótidos. La curva azul continua representa el diagrama de energía para una RNAP sin ppGpp, mientras que la línea morada discontinua es el efecto del ppGpp. Las constantes de velocidad resultantes son modificadas de $k_e =$

$A_{e_0} e^{-(\Delta G_e^+ / K_B T)}$ hacia $k_e^{ppGpp} = A_{e_0}^{ppGpp} e^{-(\Delta G_e^+ - \Delta \Delta G_{ii}^+ / K_B T)}$ (elongación; $0_i \rightarrow 0_{i+1}$) y desde $k_p = A e^{-(\Delta G_p^+ + \Delta G_{RNA} / K_B T)}$ hacia $k_p^{ppGpp} = A^{ppGpp} e^{-(\Delta G_p^+ - \Delta \Delta G_i^+ + \Delta G_{RNA} / K_B T)}$ (ingreso a pausas; $0_i \rightarrow -1_i$). Notar que la distancia hacia el estado de transición no se ha modificado.

Las nuevas energías de activación (en presencia de ppGpp) son: $\Delta G_e^+ - \Delta \Delta G_{ii}^+$ y $\Delta G_p^+ - \Delta \Delta G_i^+$ del *on-pathway* y del ingreso a pausas, respectivamente. Por lo tanto, podemos definir las constantes de velocidad (k_e y k_p) de cada proceso (con y sin ppGpp), de la siguiente manera:

$$k_e = A_{e_0} e^{-(\Delta G_e^+) / K_B T} \quad (34)$$

$$k_p = A e^{-(\Delta G_p^+ + \Delta G_{RNA}) / K_B T} \quad (35)$$

$$k_e^{ppGpp} = A_{e_0}^{ppGpp} e^{-(\Delta G_e^+ - \Delta \Delta G_{ii}^+) / K_B T} \quad (36)$$

$$k_p^{ppGpp} = A^{ppGpp} e^{-(\Delta G_p^+ - \Delta \Delta G_i^+ + \Delta G_{RNA}) / K_B T} \quad (37)$$

Donde, k_e y k_p son las constantes del *on-pathway* y del ingreso a pausas sin ppGpp (s^{-1} o nt/s), respectivamente (ecuaciones 34 y 35). k_e^{ppGpp} y k_p^{ppGpp} son las constante de velocidad del *on-pathway* y del ingreso pausas en presencia de ppGpp, respectivamente (ecuaciones 36 y 37). Además, ΔG_e^+ y ΔG_p^+ son la energía de activación para el *on-pathway* y el ingreso a pausas ($K_B T$); mientras que $\Delta \Delta G_{ii}^+$ y $\Delta \Delta G_i^+$ son la reducción en la energía de activación del *on-pathway* y del ingreso a pausas por efecto del ppGpp ($K_B T$), respectivamente (Figura 16). A_{e_0} y A son los factores pre-exponenciales del *on-pathway* y del ingreso a pausas, respectivamente; mientras que $A_{e_0}^{ppGpp}$ y A^{ppGpp} , en presencia de ppGpp.

La densidad de pausas (P_d) se relaciona con la probabilidad de entrar a pausas (P_p) mediante $P_p = P_d \cdot \langle d \rangle$, donde $\langle d \rangle$ es el desplazamiento medio de la enzima (1 pb para la RNAP) (Mejia *et al.*, 2008). De esta manera, podemos relacionar el P_d con las constante k_e y k_p sin (ecuaciones 38) y con ppGpp (ecuaciones 39):

$$P_d = \frac{k_p}{k_p + k_e} \quad (38)$$

$$P_d^{ppGpp} = \frac{k_p^{ppGpp}}{k_e^{ppGpp} + k_p^{ppGpp}} \quad (39)$$

Reemplazando las ecuaciones 34 y 35 en 38 (sin ppGpp); y 36 y 37 en 39, se obtiene:

$$P_d = \frac{Ae^{-(\Delta G_p^+ + \Delta G_{RNA})/K_B T}}{A_{e_0}e^{-(\Delta G_e^+)/K_B T} + Ae^{-(\Delta G_p^+ + \Delta G_{RNA})/K_B T}} \quad (40)$$

$$P_d^{ppGpp} = \frac{A^{ppGpp}e^{-(\Delta G_p^+ - \Delta \Delta G_i^+ + \Delta G_{RNA})/K_B T}}{A_{e_0}^{ppGpp}e^{-(\Delta G_e^+ - \Delta \Delta G_{ii}^+)/K_B T} + A^{ppGpp}e^{-(\Delta G_p^+ - \Delta \Delta G_i^+ + \Delta G_{RNA})/K_B T}} \quad (41)$$

Donde todas las constantes y magnitudes han sido descritas anteriormente.

1.1 Primera posibilidad: cambio en la energía de activación.

Para este caso, el supuesto es que las constantes A_{e_0} y A no cambian en presencia de ppGpp. Por lo tanto, $A_{e_0} = A_{e_0}^{ppGpp}$ y $A = A^{ppGpp}$. De acuerdo a esto las ecuaciones 40 y 41 pueden reescribirse introduciendo la constante de equilibrio (K_{eq}):

$$P_d = \frac{1}{K_{eq}e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T} + 1} \quad (42)$$

$$P_d^{ppGpp} = \frac{1}{K_{eq}e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T}e^{(\Delta \Delta G_{ii-i}/K_B T)} + 1} \quad (43)$$

Donde $K_{eq} = (A_{e_0}/A)e^{-(\Delta G_e^+ - \Delta G_p^+)/K_B T}$ y $\Delta\Delta G_{ii-i} = \Delta\Delta G_{ii} - \Delta\Delta G_i$ es la diferencia de la reducción de la energía de activación del *on-pathway* y del ingreso a pausas ($K_B T$) por efecto del ppGpp. Podemos observar que el ΔG_{RNA} no varía ya que se está transcribiendo sobre la misma secuencia de DNA y se produce el mismo RNA. De la diferencia $\Delta\Delta G_{ii} - \Delta\Delta G_i$ se define la variación de la densidad de pausas: si $\Delta\Delta G_{ii} > \Delta\Delta G_i$ ($\Delta\Delta G_{ii-i} > 0$) se produce una disminución de la densidad de pausas por efecto del ppGpp ($P_d > P_p^{ppGpp}$); mientras que, si $\Delta\Delta G_{ii} < \Delta\Delta G_i$ ($\Delta\Delta G_{ii-i} < 0$), entonces la densidad de pausas aumenta ($P_d < P_p^{ppGpp}$), ver ecuación 43.

1.2 Segunda posibilidad: cambio en el factor pre-exponencial.

Para este caso, el supuesto es que $\Delta\Delta G_{ii} = \Delta\Delta G_i = 0$, mientras que $A_{e_0} \neq A_{e_0}^{ppGpp}$ y $A \neq A^{ppGpp}$. De acuerdo a esto e introduciendo K_{eq} , la ecuación 41 se modifica de la siguiente manera:

$$P_d^{ppGpp} = \frac{1}{\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A^{ppGpp}} \frac{A}{A_{e_0}} K_{eq} e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T} + 1} \quad (44)$$

Se observa que cuando $\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A^{ppGpp}} < \frac{A_{e_0}}{A}$, la densidad de pausas aumenta; mientras que cuando $\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A^{ppGpp}} > \frac{A_{e_0}}{A}$, la densidad de pausas disminuye. También, cuando $\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A^{ppGpp}} = \frac{A_{e_0}}{A}$, la densidad de pausas no cambia.

VIII. RESULTADOS

1) Análisis de la RNAP de *E. coli* en elongación.

La elongación de la transcripción se realizó en modo de fuerza 4 pN constante. Bajo este modo, la trampa se desplaza para compensar el avance de la RNAP sobre el molde de DNA. Por lo tanto, en elongación y según la geometría mostrada (Figura 10), la distancia entre las esferas de poliestireno se acorta en el tiempo cuando se le agrega 1mM NTPs. La actividad de la RNAP es seguida mediante gráficas de posición (nm) vs tiempo (segundos), ver Figura 17 línea azul superior. Los datos fueron obtenidos a 1kHz (1000 datos/segundo) de frecuencia. Posteriormente, estos son filtrados para minimizar el efecto del movimiento browniano y ruido experimental con filtro Savinsky-Golay (línea blanca del inserto superior derecho, Figura 17). Posteriormente, se obtienen los *dwell time* (tiempo de permanencia de la RNAP a lo largo del DNA) y se crea un umbral (línea punteada: Figura 17, medio) para separar los estados de pausas y elongación activa. En la Figura 17, también se observa que la elongación de la RNAP se encuentra interrumpida por zonas de pausas, las cuales ocurren a diversas escalas de tiempo.

2) Velocidad libre pausas de la RNAP de *E. coli*.

Sin ppGpp, la velocidad libre de pausas es de 11.24 ± 4.8 nt/s ($R^2 = 0.68$, $N = 7$ trazas) (Figura 14, línea azul) y tiene distribución normal – unimodal. Con ppGpp, se observa que la velocidad libre de pausas aumenta a 19.24 ± 7.79 nt/s ($R^2 = 0.88$, $N = 9$); distribución normal – bimodal (Figura 18, línea roja y Tabla 11). Cuando se agrupan todos los datos de velocidad libre de pausas, estos se ajustan a una distribución normal – bimodal con velocidades de 13.047 ± 1.635 y 19.279 ± 5.144 nt/s ($R^2 = 0.97$, $N = 16$).

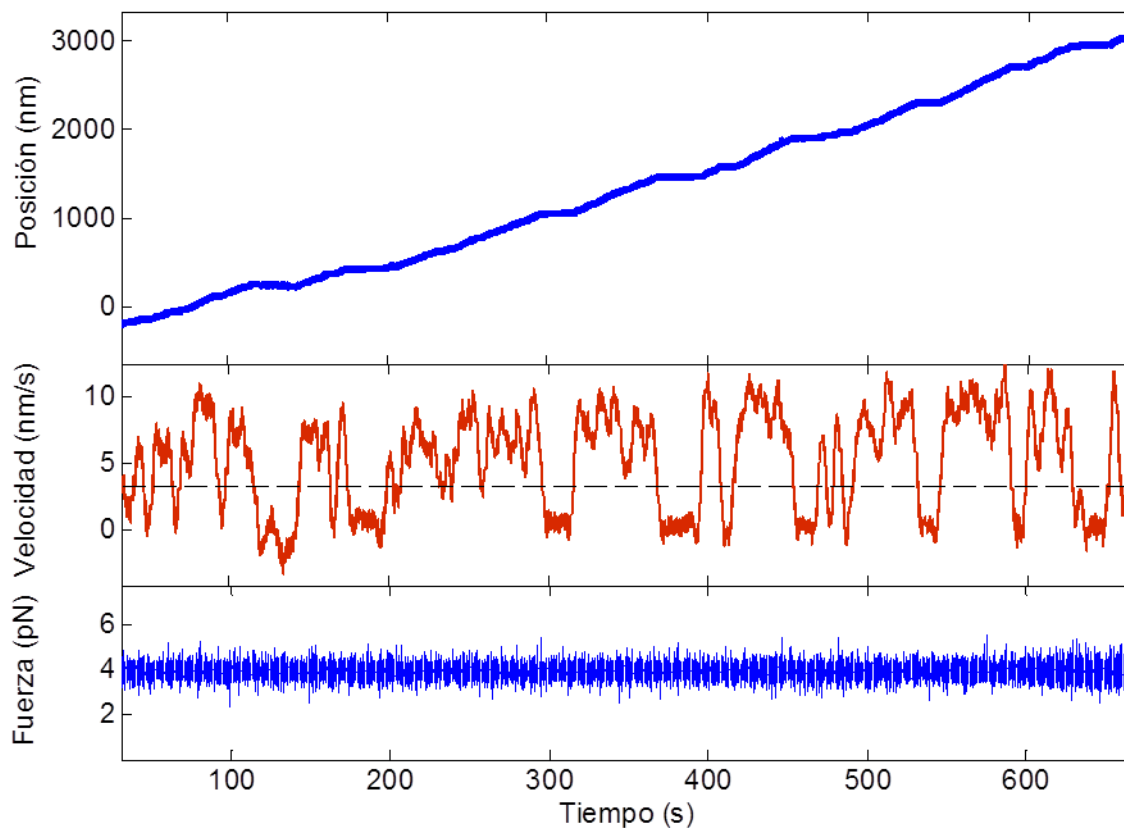


Figura 17. Figuras representativas de las trazas de actividad de la RNAP de *E. coli* a 1 mM NTPS, 21 °C y 4 pN de fuerza constante. Superior, extensión del RNA (nm) por segundo (s). Representaciones de posición (azul, superior) y velocidad (rojo, medio) en función del tiempo (s) en un molde de DNA de 6 Kb. En el inserto izquierdo se observa la separación de estados de pausas (zonas rojas) y elongación activa (zonas negras, flechas verdes). En el inserto derecho, se observa la distribución de frecuencia de la velocidad libre de pausas (equivalente a la derivada de posición vs tiempo ($dx/dt = v$) en *dwell times* por encima del umbral. Intermedio, evolución de la velocidad en función del tiempo (s) en elongación; se pueden observar los estados de pausas (por debajo de línea punteada) y la elongación activa o velocidad libre de pausas (por encima del umbral). Los valores negativos son debido al movimiento browniano. Inferior, mantenimiento de la fuerza constante a 4 pN en el tiempo.

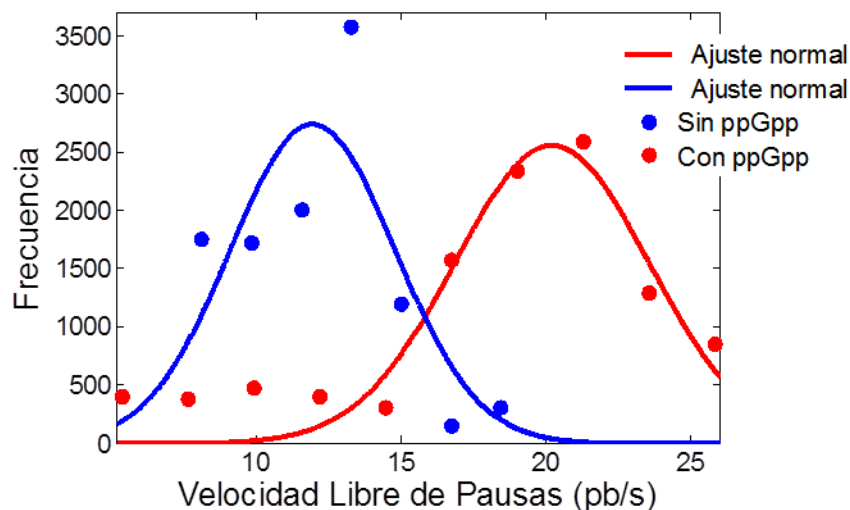


Figura 18. Ajuste de datos de velocidad libre de pausas (con y sin ppGpp) de la RNAP de *E. coli* en elongación a 1 mM NTPs y 21 °C. Los puntos indican los datos experimentales y las curvas, su ajuste a la distribución normal. Para los experimentos sin ppGpp, curva azul, esta se encuentra centrada en 3.823 ± 1.634 nm/s (11.24 ± 4.8 nt/s; $R^2 = 0.68$, $N = 7$ trazas); y con ppGpp (curva roja), 6.542 ± 2.65 nm/s (19.24 ± 7.79 nt/s; $R^2 = 0.8826$, $N = 9$).

Tabla 11. Resumen comparativo de la velocidad libre de pausas vs la velocidad total de la RNAP de *E. coli* en presencia y ausencia de ppGpp

Experimento	# Trazas	Velocidad libre de pausas (media \pm DE), nt/s	R^{2*}	Velocidad total (media \pm DE), nt/s
Sin ppGpp	7	11.24 ± 4.8	0.68	8.28 ± 2.99
Con ppGpp	9	19.24 ± 7.79	0.88	9.94 ± 4.27

*ajuste de la velocidad libre de pausas, para ensayos independientes con y sin ppGpp, a una distribución normal.

Tabla 12. Resumen de todos los datos de velocidad libre de pausas de la RNAP de *E. coli* en presencia y ausencia de ppGpp

Experimento	# Trazas	Velocidad libre de pausas (media \pm DE), nt/s	R ² *
Sin ppGpp	16	13.05 \pm 1.64	0.97
Con ppGpp		19.28 \pm 5.14	

* Ajuste de los datos a una distribución normal – bimodal para los datos con y sin ppGpp

Podemos observar en la Tabla 11 que la distribución de probabilidad de la velocidad libre de pausas se ajusta a la ecuación normal, en ausencia de ppGpp, es muy bajo ($R^2 = 0.68$); pero, cuando se agrupa con la velocidad libre de pausas de la RNAP con ppGpp, la velocidad es de 13.05 nt/s con un $R^2 = 0.97$ (Tabla 12). Finalmente, se observa, claramente, que el ppGpp induce un incremento en la velocidad libre de pausas, de 12 a 19 nt/s. A pesar que el ppGpp provoca un aumento de 12 a 19nt/s, la velocidad incluyendo pausas entre ambos experimentos es semejante: 8.28 ± 2.99 y 9.94 ± 4.27 nt/s (Tabla 11).

En la figura 19 se muestran 2 distribuciones de velocidad libre de pausas por cada experimento; se observa una heterogeneidad entre trazas, pero homogeneidad dentro de cada traza a 1 mM NTPs y 21 °C. Para A y B (sin ppGpp), la velocidad libre de pausas es de 13.56 ± 1.82 ($R^2 = 0.85$) y 8.96 ± 1.36 nt/s ($R^2 = 0.95$), respectivamente; mientras que para C y D (con ppGpp), 21.6 ± 5.25 ($R^2 = 0.993$) y 11.96 ± 1.52 nt/s ($R^2 = 0.992$), respectivamente. Excepto para la traza C, para A, B y C los valores de σ son bajos (1.82, 1.36 y 1.52 nt/s), esto indica una homogeneidad de la enzima en elongación activa. Entre enzimas, se observa una heterogeneidad en la velocidad libre de pausas; por ejemplo: sin

ppGpp se observan valores de 13.56 y 8.56 nt/s, mientras que con ppGpp, 21.6 y 11.96 nt/s (Tabla 13).

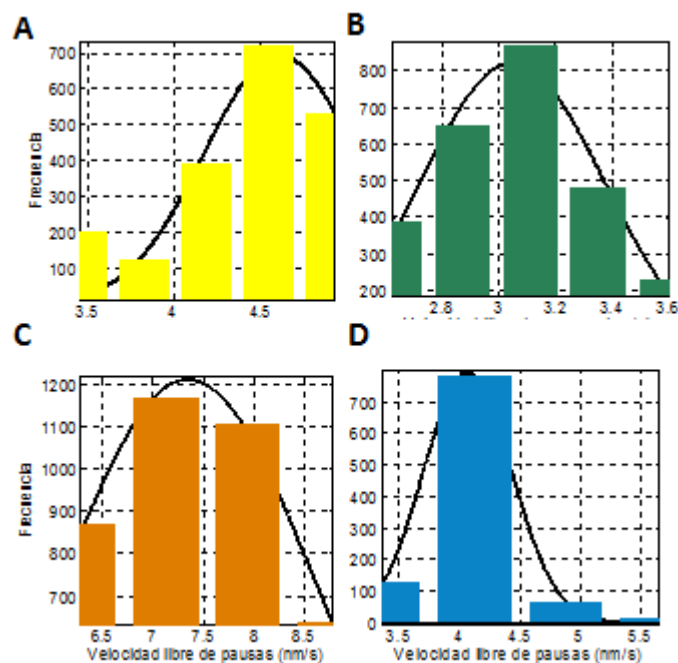


Figura 19. Distribución de velocidad libre de pausas de dos trazas respresentativas, de los ensayos con (C y D) y sin ppGpp (A y B), ajustados a una distribución normal y unimodal a 23 °C y 1 mM NTPs . Para A y B la curva normal se encuentra centrada en 4.611 ± 0.62 nm/s (13.56 ± 1.82 nt/s) y 3.048 ± 0.46 nm/s (8.96 ± 1.36 nt/s), respectivamente; mientras que para C y D, 7.348 ± 1.785 nm/s (21.6 ± 5.25 nt/s) y 4.067 ± 0.5158 nm/s (11.96 ± 1.52 nt/s), respectivamente (Tabla 12). La conversión de nm/s a nt/s se realiza por la equivalencia de 0.34 nm/pb para un B-DNA.

Tabla 13: Comparación de velocidad libre de pausas entre las RNAP de *E. coli* en elongación en presencia y ausencia de ppGpp

Experimento	Traza	Velocidad libre de pausas (media \pm DE), nt/s	R ²
Sin ppGpp	A	13.56 \pm 1.82	0.85
	B	8.96 \pm 1.36	0.952
Con ppGpp	C	21.6 \pm 5.25	0.993
	D	11.96 \pm 1.52	0.992

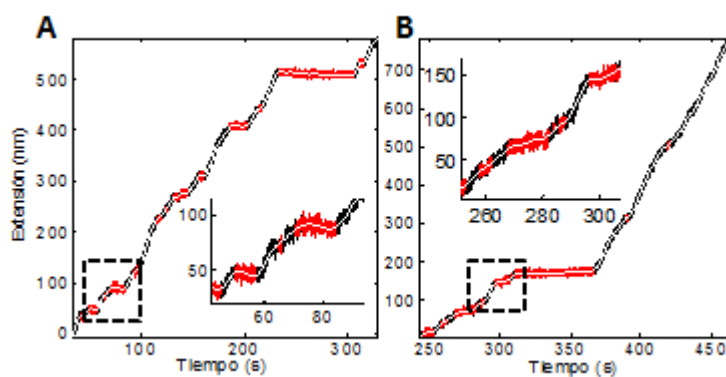


Figura 20: Gráficas representativas (tiempo vs extensión) de la elongación en la transcripción de la RNAP de *E. coli* a 1 mM NTPs, 21 °C y en ausencia (A) o presencia (B) de 200 μ M de ppGpp. A) Velocidad libre de pausas de 3.54 ± 0.44 nm/s y densidad y tiempo medio de pausas de 0.0049 pb^{-1} y 13.94 s, respectivamente. B) Velocidad libre de pausas de 5.79 ± 0.56 nm/s y una densidad y tiempo medio de pausas de 0.048 pb^{-1} y 5.06 s, respectivamente. Las zonas rojas y negras corresponden a zonas de pausas y elongación activa, respectivamente. La línea blanca es el filtro Savinsky-Golay de tercer orden de los datos recogidos con el microscopio de pinzas ópticas. En el inserto de cada figura se observa con mayor detalle las pausas; pausas largas y poco densas (sin ppGpp, A), y cortas y muy densas (con ppGpp, B).

De estos resultados se concluye que el ppGpp duplica la velocidad libre de pausas de la RNAP de *E. coli*; sin embargo la velocidad incluyendo pausas no se modifica.

También, la heterogeneidad entre enzimas y la homogeneidad de la enzima se mantienen constantes.

3) Densidad, tiempo y distribución de pausas.

En la Tabla 14 y 15 se observa que la densidad de pausas (P_d) no cambia en presencia o ausencia de ppGpp. Sin embargo, el ppGpp solo reduce del tiempo medio de duración de las pausas totales desde 8.4 ± 1.3 a 6.5 ± 0.6 s. La reducción del tiempo de pausas indica un aumento de la difusión de la RNAP en pausas ya que el tiempo y la constante de difusión se relacionan de forma indirecta. El ajuste de la distribución de pausas cortas y totales a las ecuaciones 2 y 3 (Figura 22 y 21, respectivamente), nos muestra que las pausas mantienen su origen difusivo y no se genera otro tipo de pausas. La distribución es distinta para ambas poblaciones: p-value de 0.036 y 0.033 para las pausas cortas (1 – 20 s) y totales, respectivamente (Tabla 15). Además, se observa que la constante de velocidad en pausas en ausencia de fuerza (k_0) aumenta de 0.245 ± 0.055 y 0.325 ± 0.035 s⁻¹ hacia 0.465 ± 0.175 y 0.560 ± 0.160 s⁻¹ para las pausas cortas y totales, respectivamente, por efecto del ppGpp (Tabla 14, 15 y figura 21). De estos resultados se concluye que en el *off-pathway* la RNAP mantiene su origen difusivo, no se genera un *off-pathway* adicional y la constante de velocidad se duplica por efecto del ppGpp. Para este caso, no se toman en cuenta las pausas largas. Como se mencionó, dicho proceso es producto de la reparación del extremo 3' del RNA y es impulsado por pirofosfato, el cual estuvo ausente en los experimentos.

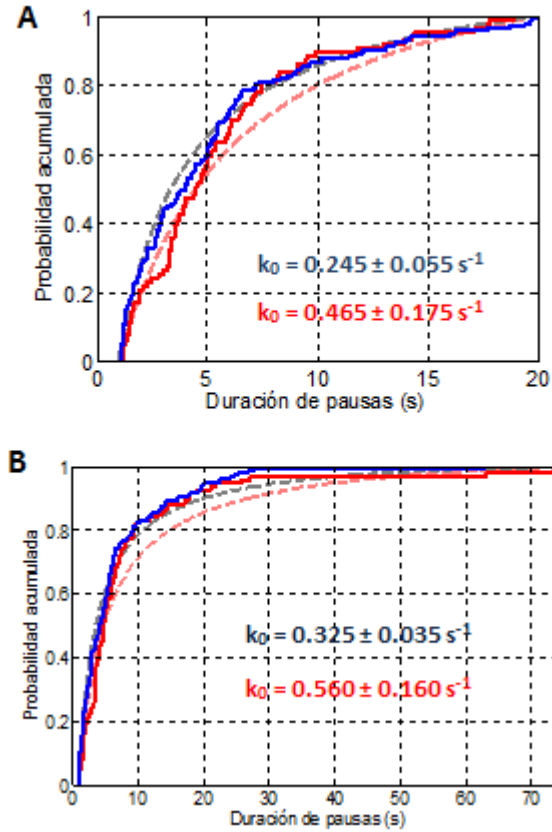


Figura 21. Distribución acumulada (duración de pausas vs probabilidad acumulada) de pausas cortas (A, 1 – 20 s) y totales (B). Las líneas continuas (azul y rojo, sin y con ppGpp respectivamente) son los datos experimentales y las líneas punteadas (gris y rozado, sin y con ppGpp respectivamente), el ajuste a la ecuación 3. Como se observa en la Tabla 15, hay diferencia significativa para los ajustes: p-value de 0.036 para pausas cortas; y 0.033 para el total. Para todas las comparaciones, la constante k_0 se incrementa de 0.245 ± 0.055 y $0.325 \pm 0.035 \text{ s}^{-1}$ a 0.465 ± 0.175 y $0.560 \pm 0.160 \text{ s}^{-1}$ para las pausas cortas y totales, respectivamente.

Tabla 14. Análisis de pausas durante la elongación en ausencia de ppGpp

	1 – 20 s	20s <	Total
k_0 (s ⁻¹)*	0.245 ± 0.055	---	0.325 ± 0.035
Tiempo (s) (media ± DE)*	5.5 ± 0.4	43.53 ± 24.87	8.4 ± 1.3
P _d teórica (Kb ⁻¹)*	7.1039	---	10.7457
P _d experimental (Kb ⁻¹)**	5.78 ± 5.44	0.204 ± 0.316	6.12 ± 5.44
n ⁺	87	7	94

* Constantes obtenidas del ajuste a la ecuación 3

** Calculado del promedio de la densidad de pausas por cada traza de actividad.

+ Número de pausas por cada tipo de pausa analizada.

Tabla 15. Análisis de pausas durante la elongación en presencia de ppGpp a 200 µM

	1 – 20 s	20s <	Total
k_0 (s ⁻¹)*	0.465 ± 0.175	---	0.56 ± 0.16
Tiempo (s) (media ± DE)*	5.2 ± 0.4	29.47 ± 13.59	6.5 ± 0.6
P _d teórica (Kb ⁻¹)*	8.0183	---	10.1357
P _d experimental (Kb ⁻¹)**	7.82 ± 5.44	0.160 ± 0.204	7.82 ± 5.44
n ⁺	145	8	153
P-value ⁺⁺	0.036	---	0.033

* Constantes obtenidas del ajuste a la ecuación 3

** Calculado del promedio de la densidad de pausas por cada traza de actividad.

+ Número de pausas por cada tipo de pausa analizada.

++ p-value de la diferencia de la distribución acumulada del tiempo de pausas (ecuación 3).

4) Difusión en pausas.

La distribución de pausas puede ser ajustada a la ecuación 16 (Figura 22). Dicha ecuación ($N(t) = t^{-3/2}/\sqrt{Ae^{-(\varepsilon/K_B T)^2}}$) fue derivada en este estudio. De lo anterior se obtuvo una energía de activación en pausas (ε) de 4.365 ± 0.081 y $4.271 \pm 0.077 K_B T$ en ausencia y presencia de ppGpp; se observa que ε no es afectado por ppGpp ($\Delta\varepsilon = 0.094 \pm 0.11 K_B T$). Del ajuste de la distribución de pausas a la ecuación 16 se obtiene ε ; de la ecuación 3 se obtiene la constante de velocidad en pausas en ausencia de fuerza (k_0). Ambos parámetros se relacionan por la ecuación de Arrhenius, $k_0 = Ae^{-\varepsilon/K_B T}$ (ecuación 6), donde A es el factor pre-exponencial. Reemplazando ε y k_0 en la ecuación 6 se obtiene A. De lo anterior, factor pre-exponencial de las pausas (A) cambia de 23.95 ± 3.23 a $67.26 \pm 5.13 s^{-1}$ por efecto del ppGpp. Por lo tanto, el origen del cambio de la constante de velocidad en pausas es por alteración del factor pre-exponencial.

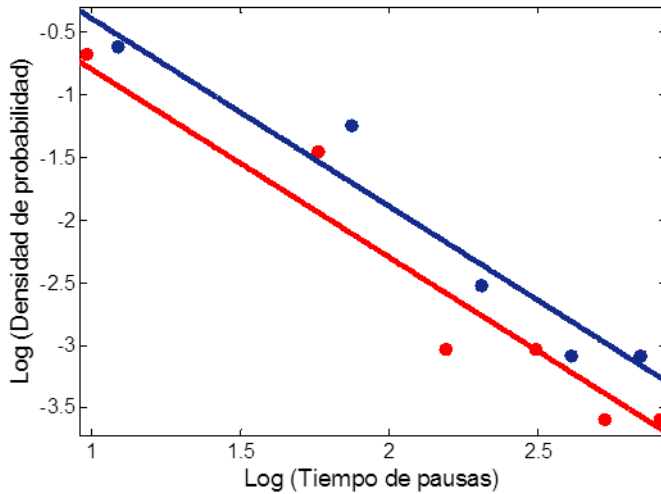


Figura 22. Se observa la distribución del tiempo de pausas cortas (1 – 20 s) (puntos) y su ajuste (líneas) a la relación $N(t) = t^{-3/2}/\sqrt{4\pi D}$. Se observa que sin (azul, $R^2 = 0.94$; $\text{Log}N(t) = -1.5\log(t) + 1.107$) o con (rojo, $R^2 = 0.93$; $\text{Log}N(t) = -1.5\log(t) + 0.701$) ppGpp el mecanismo de generación de pausas es difusivo o inducido térmicamente ($K_B T$). Es decir, no se genera un nuevo tipo de pausa.

Tabla 16. Parámetros (sin y con ppGpp) de la ecuación de arhenius para las constantes de velocidad de la RNAP en pausas

Experimento	k_0 (s ⁻¹)*	ϵ (K _B T)*	A (s ⁻¹)*
Sin ppGpp	0.325 ± 0.035	4.365 ± 0.081	23.95 ± 3.23
Con ppGpp	0.56 ± 0.16	4.271 ± 0.077	67.26 ± 5.13

* Parámetros obtenidos reemplazando en la ecuación 6

5) Cinética básica del *on-pathway*.

De las ecuaciones presentadas en la sección VII y del ajuste de la distribución de *dwel time* de los resultados de este estudio, se encontró que el mecanismo del *on-pathway* de la RNAP de *E. coli* consiste de cuatro estados en ausencia o presencia de ppGpp (Figura 23, Tabla 17 y 18). Finalmente, la distribución de *dwel time*, para ambos casos, tiene la siguiente forma:

$$\psi(t)_{1 \rightarrow 4} = \frac{k_x k_y k_z}{(k_x - k_y)(k_z - k_y)} [e^{-k_y \tau} - e^{-k_z \tau}] - \frac{k_x k_y k_z}{(k_x - k_y)(k_z - k_x)} [e^{-k_x \tau} - e^{-k_z \tau}]$$

Tabla 17. Resumen de las constantes efectivas del *on-pathway*, en ausencia de ppGpp

# de estados	k_x (s ⁻¹)	k_y (s ⁻¹)	k_z (k_{cat}) (s ⁻¹)	R ²
2	1.50 ± 0.50	---	---	0.50
3	9.09 ± 0.13	9.10 ± 0.18	---	0.82
4	17.25 ± 0.15	17.30 ± 0.13	17.11 ± 0.10	0.95

Tabla 18. Resumen de las constantes efectivas del *on-pathway*, en presencia de ppGpp

# de estados	k_x (s ⁻¹)	k_y (s ⁻¹)	k_z (k_{cat}) (s ⁻¹)	R ²
2	1.20 ± 0.6	---	---	0.29
3	8.72 ± 0.21	8.74 ± 0.23	---	0.76
4	18.09 ± 0.05	15.65 ± 0.15	16.83 ± 0.17	0.93

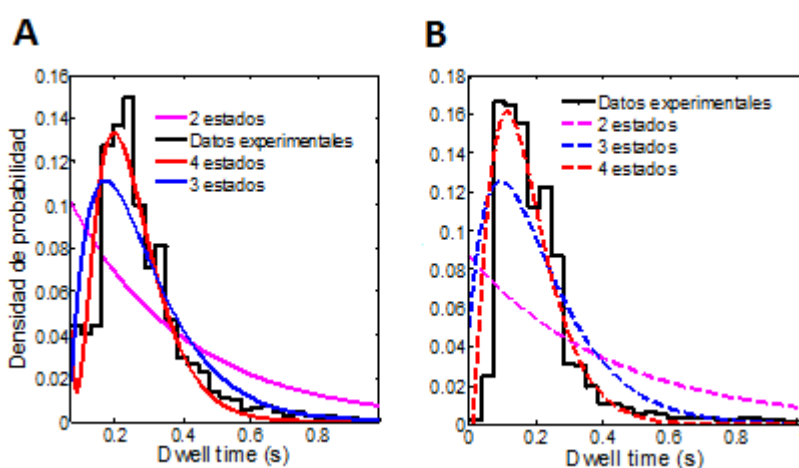


Figura 23. Distribución de los dwell time menores a 1 s (*on-pathways*) en ausencia **(A)** y presencia **(B)** de 200 μM de ppGpp, a 1 mM de NTPs, 4 pN de fuerza constante y 23 °C. Como se observa (Tabla 21 y 22), el mejor ajuste, en ambos casos, se obtiene para un modelo de 4 estados. Además, la constante de catálisis en ausencia y presencia de ppGpp es de 17.11 ± 0.10 y 16.83 ± 0.17 s⁻¹, respectivamente.

De las Tablas 17 y 18, se observa que la constante de catálisis química no sufre un cambio significativo: de 17.11 ± 0.10 a 16.83 ± 0.17 s⁻¹, en presencia de ppGpp.

6) Competencia entre el *on-pathway* y el ingreso al *off-pathway*.

La densidad de pausas (P_d) se relaciona con la constante de velocidad (k_e) y la constante de ingreso de ingreso a pausas (k_p) por $P_d = \frac{k_p}{k_p + k_e}$ (ecuación 38 y 39). La P_d y k_e se determinaron experimentalmente (Tabla 12, 14, 15); la k_e es numéricamente igual a la velocidad libre de pausas (Mejia *et al.*, 2008). Por lo tanto, podemos calcular k_p . Se observa que k_p cambia de 0.069 ± 0.046 a $0.139 \pm 0.129 \text{ s}^{-1}$, por efecto del ppGpp. En la tabla 16 se obtuvo que $A = 23.95 \pm 3.23 \text{ s}^{-1}$ y $A^{ppGpp} = 67.26 \pm 5.13 \text{ s}^{-1}$. Si suponemos que las pausas y el ingreso a pausas son de la misma naturaleza, entonces ambos procesos tienen el mismo factor pre-exponencial (Dangkulwanich *et al.*, 2013). Por lo tanto, se cumple que $k_p = Ae^{-\Delta G_p^+/K_B T}$, donde ΔG_p^+ es la energía de activación de ingreso a pausas y A es obtenido de la Tabla 16. Se obtuvo que ΔG_p^+ se mantiene constante en presencia de ppGpp: de 5.85 ± 0.68 a $6.18 \pm 0.93 K_B T$ (Tabla 19). Finalmente, se concluye que no se observan cambios en la energía de activación en pausas y en el ingreso a pausas; por lo tanto, se acepta el modelo de cambio del factor pre-exponencial: ecuación 44.

$$P_d^{ppGpp} = \frac{1}{\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A^{ppGpp}} \frac{A}{A_{e_0}} K_{eq} e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T} + 1}$$

La velocidad libre de pausas tiene un factor pre-exponencial (A_e) que diferente al de las pausas e ingreso a pausas. En ausencia de ppGpp, $A_e = 1.18 \times 10^8 \text{ nt/s}$ (Mejia *et al.*, 2008), (Tabla 20). Usando dicho valor en la ecuación 44, se obtiene que $A_{e_0}^{ppGpp} = 3.31 \times 10^8 \text{ nt/s}$. Se concluye que el factor pre-exponencial de la velocidad libre de pausas también aumenta por efecto del ppGpp.

Tabla 19. Comparación de la velocidad libre de pausas, densidad de pausas y la constante de equilibrio

Ensayo	$P_d \text{ (pb}^{-1}\text{)} \times 10^{-3}$	$K_{eq} e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T}$	$k_p \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_p^+ (K_B T)$
Sin ppGpp	6.12 ± 3.16	162.399 ± 83.369	0.069 ± 0.046	5.85 ± 0.68
Con ppGpp	6.97 ± 6.15	142.472 ± 125.593	0.139 ± 0.129	6.18 ± 0.93

NOTA: En este caso, los parámetros ΔG_p^+ y ΔG_e^+ son referidos para los experimentos con y sin ppGpp.

Tabla 20. Cambio de los parámetros difusivos por efecto del ppGpp.

Ensayo	$A \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_0 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$A_{e_0} \text{ (x10}^8\text{nt/s)}$
Sin ppGpp	23.95 ± 3.23	0.325 ± 0.035	1.18*
Con ppGpp	67.26 ± 5.13	0.56 ± 0.16	3.31

* Tomado de Mejía *et al.*, 2008.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1) El ppGpp duplica la velocidad libre de pausas.

La velocidad libre de pausas de la RNAP obtenida de métodos de moléculas individuales es heterogénea (Yin *et al.*, 1999; Kasas *et al.*, 1997; Guthold *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2001; Davenport *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1995; Mejia *et al.*, 2008; Adelman *et al.*, 2002; Forde *et al.*, 2002; Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004; Neuman *et al.*, 2003), ver también Figura 11 y 13. Esta depende de la concentración de NTPs, de la temperatura y la fuerza sobre la enzima (Yin *et al.*, 1999; Kasas *et al.*, 1997; Guthold *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2001; Davenport *et al.*, 2000; Forde *et al.*, 2002; Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2008). La mayoría de estudios realizan los ensayos a concentraciones saturantes de NTPs (1mM) y a 21 °C (Davenport *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1995; Adelman *et al.*, 2002; Neuman *et al.*, 2003; Mejia *et al.*, 2008). Los estudios con microscopía de pinzas ópticas muestran que la velocidad libre de pausas de la RNAP de *E. coli* tiene una distribución normal y unimodal, con valores centrados en 15.9 ± 6.6 (Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004), 14.25 ± 4.5 (Adelman *et al.*, 2002) y 9.7 ± 4.8 nt/s (Neuman *et al.*, 2003). A diferencia de estos estudios, la RNAP es muy lenta en la superficie de la mica en estudios con microscopía de fuerza atómica (Kasas *et al.*, 1997; Guthold *et al.*, 1999), ver también Tabla 21. A las condiciones estudiadas (1 mM de NTPs, 21 °C y 4 pN de fuerza constante) hemos hallado una velocidad libre de pausas de 11.24 ± 4.8 nt/s. La velocidad total (incluyendo pausas) en nuestro caso fue 8.28 ± 2.99 pb/s (Tabla 11), muy cercano a otros estudios: 8.0 ± 3.0 (Davenport *et al.*, 2000) y 6.2 ± 0.4 nt/s (Neuman *et al.*, 2003). También, podemos observar que la desviación estándar (4.8 nt/s), ver Tabla 11, es similar a la referencia: 6.6 (Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004), 4.5 (Adelman *et al.*, 2002) y 4.8 nt/s (Neuman *et al.*, 2003).

Tabla 21. Velocidad libre de pausas de la RNAP de *E. coli* obtenido con métodos de manipulación de moléculas individuales

Velocidad libre de pausas (Media \pm DE) (nt/s)	# de trazas	T (°C)	[dNTPs] (mM)	Referencia
15.9 \pm 6.6	140	24 \pm 0.4	0.5	(Tolić-Nørrelykke et al., 2004),
10 \pm 3	32	23	1	(Yi <i>et al.</i> , 1995)
15 \pm 5	28	23	1	
7.3 \pm 3	38	21	0.2	(Davenport <i>et al.</i> , 2000)
14.5 \pm 4	38	21	1	
7.9 \pm 0.9	22	21	0.2	(Forde <i>et al.</i> , 2002)
4.4 \pm 6.8	7	---	1	(Yin <i>et al.</i> , 1994)
14.25 \pm 4.5	30	---	1	(Adelman <i>et al.</i> , 2002)
3 – 22		7 - 45	1	(Mejia <i>et al.</i> , 2008)
9.7 \pm 4.8	130	21	1	(Neuman <i>et al.</i> , 2003)
22 \pm 6.6	---	23 \pm 2	0.0025 – 1	(Harada <i>et al.</i> , 2001)
1.5 \pm 0.8	20	30	0.005	(Guthold <i>et al.</i> , 1999)
0.4 – 1	100	21	0.0025	(Kasas <i>et al.</i> , 1997)
1.9	1	21	0.005	

La velocidad libre de pausas de la RNAP es heterogénea entre enzimas (Figura 18 y Tabla 13) (Yin *et al.*, 1999; Kasas *et al.*, 1997; Guthold *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2001;

Davenport *et al.*, 2000; Forde *et al.*, 2002; Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2008). A pesar que muchos autores mencionan que el origen de esta heterogeneidad es desconocida (Tolić-Nørrelykke *et al.*, 2004), es probable que la explicación se encuentre en la purificación nativa de la RNAP de *E. coli* usada para ensayos de moléculas individuales. La RNAP es heterogénea a nivel celular ya que interacciona de forma reversible con reguladores (NusA, NusG, GreA, GreB, DksA), chaperonas (DnaK, DnaJ), factores sigma (σ^{70} , σ^S , σ^{54} , etc.), entre otros (Lee *et al.*, 2008; Mukherjee y Chatterji, 2008). A pesar del uso de la cromatografía de intercambio iónico, afinidad o exclusión molecular, la holoenzima ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) o enzima núcleo ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) puede mantener sus factores agregados. La purificación nativa mantiene el complejo $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ y no discrimina de factores adicionales, pues no se puede diferenciar durante la cromatografía de exclusión molecular si la holoenzima tiene factores de transcripción unidos con tamaño menor al 10% del $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ (450 kDa). De lo mencionado, es probable que la holoenzima ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$), utilizada en los estudios de moléculas individuales, esté unida a factores de elongación, iniciación o terminación en cantidades subestequiométricas; lo cual genera una heterogeneidad en la velocidad libre de pausas. Esto se confirma en experimentos de transferencia fluorescente de energía resonante (FRET), donde dicha heterogeneidad también es observada a nivel estructural en complejos ternarios de elongación (Coban *et al.*, 2006).

La velocidad libre de pausas en presencia de 200 μM de ppGpp genera una velocidad libre de pausas de 19.85 ± 5.45 (Tabla 11 y 12, Figura 18). En los estudios *in vitro* con métodos bioquímicos y de biología molecular tradicional (Kingston *et al.*, 1981; Vogel y Jensen, 1994; Woody *et al.*, 1987) se observa que la velocidad es menor en presencia de ppGpp; de 14 a 8 s^{-1} (diferencia significativa después de los 10 min). Sin embargo, estos métodos no pueden excluir las pausas de los estados de elongación

activa ya que no pueden sincronizar la actividad de una población grande de RNAP (Bai *et al.*, 2006; Herbert *et al.*, 2008).

En la Figura 18, se observa una pequeña población con una velocidad libre de pausas menor a las condiciones sin ppGpp. Esto puede estar relacionado con dos formas de unión del ppGpp a la RNAP de *E. coli*, pero a un único sitio. Artsimovich *et al.*, (2004) reporta que el ppGpp se une de doble forma a la RNAP de *T. thermophilus*. Las interacciones con la guanina se mantienen constantes en la RNAP, pero el cambio en la posición de los fosfatos altera la interacción con las subunidades β y β' , principalmente a nivel del Asp β 686 y Asp β' 739 (Artsimovitch *et al.*, 2004). En la RNAP de *E. coli*, el sitio de unión a ppGpp se encuentra a 28 y 25 Å del sitio activo y sitio homólogo de unión del ppGpp a la RNAP de *T. thermophilus*, respectivamente (Zuo *et al.*, 2013). Debido a la simetría de los 5' y 3' pirofosfatos, es posible una doble forma de unión del ppGpp; esto es sugerido por Zuo *et al.*, 2013. La actividad de la RNAP de *E. coli* y de *T. thermophilus*, en presencia de ppGpp, no comparten las propiedades funcionales y estructurales (Vrentas *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2013). Futuros estudios de *crosslinking* con análogos de ppGpp (6-tio-ppGpp o azido-ppGpp) (Sato *et al.*, 2009; Chatterji *et al.*, 1998; (Touloukhonov *et al.*, 2001) a nivel del β -fosfato, nos confirmará si el ppGpp tiene doble forma de unión a la RNAP de *E. coli*. Sin embargo, debido a la escasez de dicha población, no se tomó en cuenta para el análisis.

2) El ppGpp duplica la tasa de difusión de la RNAP

La elongación de la RNAP, estudiada a nivel de moléculas individuales, se encuentra interrumpida por estados de pausas (Herbert *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2006; Larson *et al.*, 2011). Las pausas ocurren a diversas escalas de tiempo (t); y pueden dividirse en pausas cortas ($1 < t < 10$ o $1 < t < 20$ s) (Depken *et al.*, 2009; Galburt *et al.*, 2007; Xie, 2009; Neuman *et al.*, 2003) y largas ($20 \text{ s} < t$) (Xie, 2012; Xie, 2009; Shaevitz *et*

al., 2003; Maoiléidigh *et al.*, 2011), ver Tabla 10. En este estudio solo se han analizado las pausas entre 1 – 20 s y totales ya que no tenemos suficientes datos para el análisis de pausas entre 1 – 10 s. El mecanismo de origen de las pausas es controvertido. La distribución de pausas cortas se ajusta a $N(t) = t^{-3/2}/\sqrt{4\pi D}$ (Galburt *et al.*, 2007), (Ecuación 2) o $N(t) = \sqrt{k_f/k_b}(e^{-(k_f+k_b)t}/t)I_1(2t\sqrt{k_f k_b})$ (Zamft *et al.*, 2012; Hodges *et al.*, 2009) (Ecuación 4). Esto indica que el origen de las pausas cortas y largas es difusiva: inducidos térmicamente por el medio ($K_B T$). Otros autores indican que las pausas cortas y largas tienen origen en mecanismos distintos. Neuman *et al.*, (2003) indica que las pausas largas son sensibles a fuerza altas (10 pN), pero las cortas no. Además, también menciona que las pausas cortas entre 1 y 10 s tiene una distribución exponencial ($N(t) = Ae^{-(t/\tau)}$); mientras que las pausas entre 1 y 20 s, doble exponencial ($N(t) = Ae^{-(t/\tau_1)} + Be^{-(t/\tau_2)}$), donde el parámetro τ es la media de duración de pausas (Neuman *et al.*, 2003; Maoiléidigh *et al.*, 2011). Sin embargo, Hodges *et al.*, (2009) mencionan que las pausas cortas son insensibles a fuerzas altas (10 pN) ya que el desplazamiento de 1 o 2 pb (0.17 y 0.34 nm en la distancia de transición) requiere un trabajo ($W = F.d$) equivalente a 1.7 o 3.4 pN.nm, los cuales son menores a la energía térmica del medio ($K_B T = 4.1$ pN.nm, 25 °C). Sin embargo, desplazamientos en pausas largas (3, 4 o 5 pb) (Shaevitz *et al.*, 2003) generan trabajo de 5.1 – 8.5 pN.nm, los cuales son mayores a la energía térmica del medio (4.1 pN.nm < 5.1 – 8.5 pN.nm) (Hodges *et al.*, 2009). Por esta razón, las pausas largas son sensibles a fuerzas altas aplicadas sobre la RNAP. En la Figura 22 se observa que, con o sin ppGpp, la distribución del tiempo de pausas se ajustan a $t^{-3/2}$ con $R^2 = 0.94$ y 0.95 , respectivamente. Por lo tanto, el ppGpp mantiene la naturaleza difusiva de las pausas.

E. coli tiene, aproximadamente, de 2000 – 5000 RNAPs/genoma y la mayoría se agrupa en operones ribosomales (1 RNAP en iniciación/segundo y 58 pb de separación

en elongación) llamados focos de transcripción en el nucleóide (Jin y Cabrera, 2006). Durante la respuesta estricta (medio deficiente en aminoácidos, estrés osmótico o inducción con serina-hidroxamato) (Cabrera y Jin, 2003; Cagliero y Jin, 2013) o con RNAP “estrictas”, la RNAP se libera de los focos de transcripción y se distribuyen de forma uniforme en el citoplasma (Jin y Cabrera, 2006; Cabrera y Jin, 2003; Cagliero y Jin, 2013). Dicho fenotipo puede explicarse por la disminución de las interacciones de la RNAP con el DNA, inducido por el ppGpp, de la siguiente manera: la elongación no es el único proceso donde la fuerza de interacción de la RNAP y DNA son determinantes; también lo es en la búsqueda del promotor, en todo el proceso de iniciación, en el aclaramiento del promotor y en la terminación. La búsqueda del promotor se produce por un equilibrio entre estados de búsqueda en solución (3D) y difusión sobre DNA inespecífico (1D) (difusión facilitada) (Ricchetti *et al.*, 1988), el cual es dependiente de las interacciones con el DNA. Dicha interacción puede ser “débil” en presencia de ppGpp y, por lo tanto, desplazar el equilibrio a una búsqueda de secuencias blanco en 3D. Esto ocasionaría una mayor concentración de RNAP libre y disminución de focos de transcripción durante la respuesta estricta en *E. coli*, (Cabrera *et al.*, 2009; Jin y Cabrera, 2006; Cabrera y Jin, 2003; Cagliero y Jin, 2013).

3) El ppGpp triplica el factor pre-exponencial del mecanismo difusivo.

El mecanismo de búsqueda de secuencias blanco en proteínas de unión a DNA sigue varios mecanismos: deslizamiento, colisión aleatoria, *hooping*, transferencia intersegmental o traslocación (Gorman y Greene, 2008). El movimiento de las proteínas que deslizan sobre DNA de forma aleatoria en 1D y siguen su helicidad, está regido por la ecuación 13 ($\xi_{total}D = K_B T$), donde la constante de difusión es dada por la ecuación 11 (Bagchi *et al.*, 2008; Blainey *et al.*, 2009; Zwanzig, 1988).. La RNAP sigue la helicidad del DNA en elongación (Harada *et al.*, 2001). Durante la difusión en pausas, la RNAP sigue la helicidad del híbrido DNA-RNA. Suponiendo esto, y que las pausas son de naturaleza

difusiva (Hodges *et al.*, 2009; Depken *et al.*, 2009; Galburt *et al.*, 2007; Xie, 2009; Xie, 2012), el movimiento de la RNAP en pausas puede ser descrito por la ecuación 16:

$$N(t) = \frac{t^{-3/2}}{\sqrt{Ae^{-(\varepsilon/K_B T)^2}}}$$

En el presente estudio se reporta por primera vez la energía de activación media en pausas ($\varepsilon \approx 4.4 K_B T$) para la RNAP (Tabla 16). Este valor se encuentra muy cercano a la ruptura de pares DNA-DNA y DNA-RNA ($\approx 8 K_B T$); ya que, en pausas, la longitud del híbrido DNA-RNA del sitio activo y el DNA en interacción con la RNAP se mantiene constante a pesar de su movimiento (Sidorenkov *et al.*, 1998; Geszvain y Landick, 2005; (Dangkulwanich *et al.*, 2013). Como se observa (Tabla 16), el ppGpp no afecta la energía de activación media en pausas ($\Delta\varepsilon = 0.09 \pm 0.11 K_B T \ll 1 K_B T$).

En las Tabla 16 y 19 se observa que la diferencia de la energía de activación en pausas ($\Delta\varepsilon = 0.09 \pm 0.11 K_B T$) y en el ingreso a pausas ($\Delta\Delta G_p^+ = 0.33 \pm 1.15 K_B T$) no cambia. Por lo tanto, el origen del cambio de la constante de velocidad en pausas (0.325 ± 0.035 a $0.56 \pm 0.16 s^{-1}$) y del ingreso a pausas (0.069 ± 0.046 a $0.139 \pm 0.129 s^{-1}$) es debido al incremento del factor pre-exponencial: 23.95 ± 3.23 a $67.26 \pm 5.13 s^{-1}$. Debido a esto, se descartó el mecanismo de acción sobre la energía de activación ($\Delta\Delta G_{ii}^+ = \Delta\Delta G_i^+ = 0$). Por lo tanto, la ecuación que describe el mecanismo de competencia del *on-pathway* y el ingreso a pausas es:

$$p_d^{ppGpp} = \frac{1}{\frac{A_{e_0}^{ppGpp}}{A_{e_0}^{ppGpp}} \frac{A}{A_{e_0}} K_{eq} e^{-\Delta G_{RNA}/K_B T} + 1}$$

A partir de dicha ecuación y de la densidad de pausas (tabla 14 y 15) se calculó el factor pre-exponencial del *on-pathway*: $A_{e_0}^{ppGpp} = 3.31 \times 10^8$ nt/s. Para este caso, A_{e_0} es el

factor pre-exponencial global del *on-pathway* (numéricamente igual a la velocidad libre de pausas) (Mejia *et al.*, 2008).

4) El ppGpp no modifica el número de estados del *on-pathway* ni el valor del k_{cat} .

Sin tener en cuenta los estados de pausas, el mecanismo básico enzimático de la RNAP, en presencia o ausencia de ppGpp, consiste de 4 estados (Figura 23, Tabla 17 y 18). Esto se observa del ajuste de los *dwell time* cortos a las ecuaciones 17, 20 y 23. En la Tabla 17 se observa que, solo hay un mejor ajuste cuando se consideran 4 estados ($R^2 = 0.95$), de la misma manera es para el *on-pathway* en presencia de 200 μ M de ppGpp ($R^2 = 0.93$), ver Figura 23. De lo obtenido, los modelos válidos de la literatura son los propuestos por Dangkulwanich *et al.*, 2013; Abbondanzieri *et al.*, 2005; O'Maoiléidigh *et al.*, 2011; y Bai *et al.*, 2004. De acuerdo al modelo presentado en este estudio, la constante de velocidad Markov k_z es igual a k_{cat} (constante de condensación de NTPs) y se obtuvo un valor de $k_{cat} = 17.11 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$, muy cercano a la referencia (Bai *et al.*, 2007; Mejia 2009; Shaevitz *et al.*, 2003; Xie, 2012; Abbondanzieri *et al.*, 2006). En presencia de ppGpp, el valor del k_{cat} cambia muy poco ($16.83 \pm 0.17 \text{ s}^{-1}$); por lo tanto, es probable que el ppGpp no afecte en gran medida a la catálisis química. Este es el primer estudio que reporta la determinación sistemática del número de estados del *on-pathway* y de la constante de catálisis a partir de la distribución de *dwell time*.

5) La regulación por ppGpp y su relación con la estructura de la RNAP.

El regulador DksA, que es estructuralmente parecido a GreA y GreB, se ha reportado que genera efectos similares al ppGpp en los promotores de síntesis de aminoácidos, P_{uspA} , P_{livJ} , y P_{rmBP1} , en la transcripción dependiente de sigma 54 (σ^{54}), reducción de la velocidad de transcripción, agregación celular, motilidad, filamentación y morfología celular; pero efectos opuestos en la adhesión celular (Aberg *et al.*, 2009;

Magnusson *et al.*, 2007; Bernardo *et al.*, 2006; Rutherford *et al.*, 2007; Furman *et al.*, 2012; Vinella *et al.*, 2012). La proteína DksA interacciona con la RNAP y modula la actividad del TLH a través del canal secundario (ingreso de NTPs) (Lennon *et al.*, 2012; Furman *et al.*, 2013). De acuerdo a lo anterior, es probable que el ppGpp module la actividad de la RNAP de *E. coli* (de forma alostérica) a nivel del plegamiento/desplegamiento del TLH. El TLH juega un rol importante en el ingreso a pausas (*first backtracking*) y en todo el proceso de elongación activa en la RNAP bacteriana y eucariota (Yuzenkova y Zenkin, 2010; Larson *et al.*, 2012; Dangkulwanich *et al.*, 2013).

Algunos reportes relacionan la fuerza de interacción de la RNAP con dwDNA y el tiempo de pausas en elongación de forma inversamente proporcional (Ederth *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1990; Palangat *et al.*, 2004). Chakraborty *et al.*, (2012) mencionan que el β' *clamp* se encuentra desorganizado y, cuando la RNA polimerasa interacciona con el DNA, el β' *clamp* se pliega y cierra (en iniciación y elongación); de esta manera se ajusta al dwDNA. La movilidad del β' *clamp* se encuentra controlado por el β' switch 1 (SW1) y, principalmente, por el β' switch 2 (SW2) (Pupov *et al.*, 2010; Belogurov *et al.*, 2009). La relación entre la fuerza del promotor y la apertura o cierre del β' *clamp*, mediado por la acción del SW2, se estableció con el uso del antibiótico mixopironina (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Las mutaciones β R454H, β' Δ 215-220, β S531F, β D532A, β L533P, β T563P, β Δ 446-448, β L571P y β H1244Q generan RNAP “estrictas”, tienen un fenotipo semejante a la RNAP *wt* unida al ppGpp (Barker *et al.* 2001b; Zhou y Jin, 1998). Barker *et al.*, (2001) proponen que estas mutaciones favorecen el “*jaw opening*” (β' *clamp* y β *jaw*); esto provoca la disminución del tiempo de vida de complejos los complejos de iniciación de la RNAP con los promotores *rrnB* P1, *rpoD* P1 y λP_R (Barker *et al.*, 2001b; Bartlett *et al.*, 1998). Zhou *et al.*, (1998) observaron que los complejos de iniciación con RNAP

“estrictas” (S531F, D532A y T563P) con los promotores *rrnB* P1, *pyrBI*, *rpoD* P1 y P2 son más sensibles a diferentes concentraciones de heparina, sales (KCl) y poli[d(A.T)] que la RNAP silvestre.

De lo mencionado, se propone un mecanismo de acción en pausas: El ppGpp disminuye las interacciones con el dwDNA y evita el cierre completo del β' clamp mediante la modulación del SW2. Lo anterior explicaría lo observado en este estudio: aumento del factor pre-exponencial (Tabla 16). El modelo propuesto también explicaría el efecto del ppGpp en la disminución del *wrapping* del DNA en la RNAP en el promotor λP_R (Rodríguez, 2010). Futuros experimentos de smFRET (*single molecule Foster Resonance Electron Transfer*) con fluoróforos a nivel del β' clamp y β jaw (colectivamente conocidos como las pinzas de la RNAP) (Chakraborty *et al.*, 2012), nos mostrará si el ppGpp provoca un ajuste incompleto del dwDNA a nivel de los complejos ternarios de elongación (CTE). Debido a que el SW2 y TLH se encuentran conservados en bacterias (Iyer *et al.*, 2003; Belogurov *et al.*, 2009), este modelo puede extenderse a otros organismos como *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, entre otros.

Hasta la fecha no existe ningún estudio del efecto de las sales en la constante de disociación (K_D) del ppGpp de la RNAP; debido a esto, es imposible estudiar la sensibilidad CTE, en presencia de ppGpp, a sales. Esto se debe a que el sitio de unión del ppGpp en la RNAP es positivamente cargado (Zuo *et al.*, 2013) y, en presencia de sales, no podemos excluir la desestabilización de los CTE y la menor fuerza de unión del ppGpp. Futuros experimentos con 1-aminonaftaleno 4-sulfonato-ppGpp (AmNs-ppGpp) (Reddy y Raghavan, 1995) nos mostrarán el efecto de las sales en el K_D en la RNAP de *E. coli*. Una vez determinado esto, el siguiente paso será evaluar el efecto de las sales (KCl, NaCl) en la reanudación o estabilidad de los CTE detenidos (“*stall* o *halted complex*”) en presencia de ppGpp. Además, estos estudios pueden extenderse a nivel de

la búsqueda del promotor, iniciación, aclaramiento del promotor y terminación. Dichos experimentos serían un soporte claro al modelo de la disminución de las interacciones del DNA y RNAP en presencia de ppGpp.

6) Modelo de acción del ppGpp en elongación.

El ppGpp triplica el factor pre-exponencial de la difusión (Tabla 20 y 25). Las pausas, el ingreso a pausas y la cinética entre el estado pre y pos-translocado son de naturaleza difusiva (Dangkulwanich *et al.*, 2013; Larson *et al.*, 2012). No se observaron cambios en el valor del k_{cat} (Tabla 25). El ppGpp se ubica a 28 Å del sitio activo y no tiene efecto de inhibición competitiva con los NTPs (Kingston *et al.*, 1981; Zuo *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2013; Mechold *et al.*, 2013). Por lo tanto, se plantea que el ppGpp acelera la difusión de la RNAP, acelera el *brownian ratchet* o “lubrica” el movimiento de la RNAP sobre el DNA. De esta manera, el origen de la duplicación de la velocidad libre de pausas (Tabla 25) es la aceleración de la cinética entre el estado pre y pos-translocado.

7) La termodinámica de las pausas en la RNAP de *E. coli*.

A partir de las tablas 16 y 19, se puede construir el diagrama de energía de las pausas y del ingreso a pausas (Figura 24). Dangkulwanich *et al.*, (2013) mencionan que el ingreso a pausa es termodinámicamente favorecida ($\Delta G \approx 2 K_B T$) pero cinéticamente desfavorecida ($\Delta G_p^+ \approx 6 K_B T$) en la RNAP pol II de *S. cerevisiae* (Dangkulwanich *et al.*, 2013). Sin embargo, en este estudio, en la RNAP de *E. coli* se observa que el ingreso a pausas es cinética y termodinámicamente desfavorecido; $\Delta G \approx -2 K_B T$ ($\epsilon - \Delta G_p^+$) y $\Delta G_p^+ \approx 6 K_B T$ (Tabla 19, ecuación 38 y 39), respectivamente. Hasta la fecha, el presente estudio propone una ecuación general para calcular la energía de activación en pausas de cualquier motor molecular (ecuación 16). De acuerdo a esta ecuación dicha energía es menor en 4 $K_B T$ a la energía requerida para romper pares de bases RNA-DNA y DNA-

DNA ($8 K_B T$) durante el movimiento *forward* y de *backtracking* de la RNAP de *E. coli* en pausas. Gracias a esta ecuación se logró determinar que el ppGpp no afecta la energía de activación en pausas.

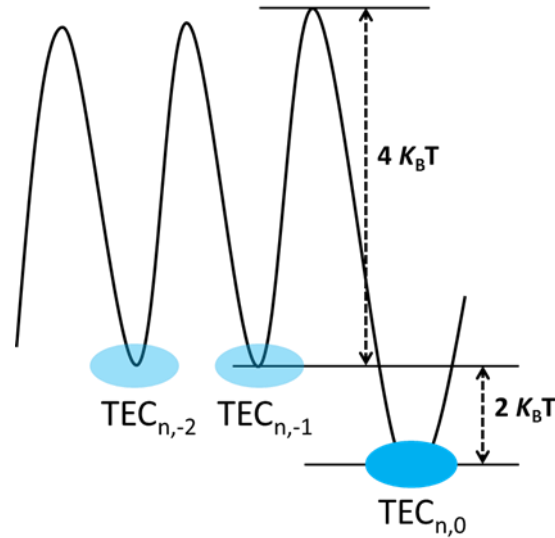


Figura 24. Diagrama de energía de las pausas, en ausencia y presencia de $200\mu M$ de ppGpp. La diferencia de energía libre entre el estado $TEC_{n,0}$ y $TEC_{n,-1}$ es $-2 K_B T$; mientras que la energía de activación para el primer *backtracking* o del ingreso a pausas es de $6 K_B T$ (Tabla 19, ecuación 38 y 39). En pausas, la energía de activación es de $\epsilon = 4 K_B T$ (Tabla 16, ecuación 16), cercano a la ruptura de pares de bases RNA-DNA y DNA-DNA. La esfera celeste representa a la RNAP de *E. coli*.

8) Modelo general de mecanismos enzimáticos.

En la sección VII.b se diseñó un sistema de ecuaciones para describir el mecanismo cinético de cualquier motor molecular. Sin embargo, este esquema es más amplio ya que la parte descriptiva para motores moleculares empieza usando la relación $\langle d \rangle = v \langle t \rangle$; es decir, el esquema principal (descripción markoviana de los *dwel time* unificado a las constantes efectivas de la teoría de cleland) puede aplicarse a cualquier mecanismo enzimático (Figura 25).

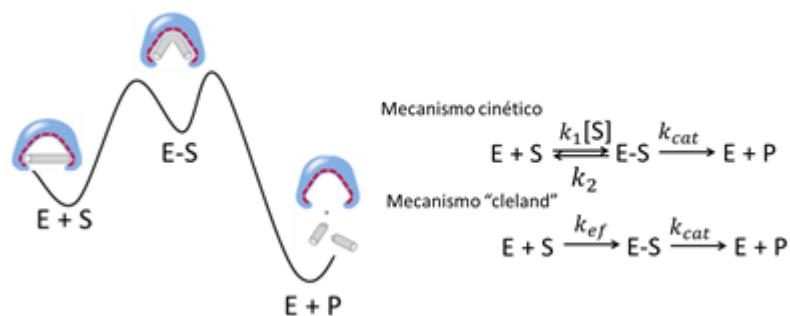


Figura 25. A) Diagrama energético de una reacción enzimática canónica. Se observa que, entre los reactantes y productos, hay un intermediario E-S; **B)** Esquema cinético de reacción correspondiente con el diagrama de energía, además se muestra el mismo esquema mediante constantes efectivas.

La distribución general de una reacción enzimática es:

$$\psi(t)_{E+S \rightarrow E+P} = \left(\frac{k_{ef}k_{cat}}{k_{ef} - k_{cat}} \right) (e^{-k_{cat}t} - e^{-k_{ef}t})$$

De acuerdo a la sección VII, la constante $k_{ef} = \frac{k_{cat}k_1[S]}{k_{cat} + k_2}$ y suponiendo que la distancia química entre los estados E + S y E + P es x^+ , se cumple que $\langle x^+ \rangle = v\langle t \rangle$. Por lo tanto, la ecuación de velocidad se convierte en:

$$v = \frac{[S]k_{cat}x^+}{[S] + \frac{k_{cat} + k_2}{k_1}}$$

Donde v es la velocidad de la reacción medida como $v = \frac{d[P]}{dt}$ y, mediante una curva de saturación, se obtienen las constantes: $V_{max} = k_{cat}x^+$ y $K_{max} = \frac{k_{cat} + k_2}{k_1}$. Como se observa, en el modelo propuesto no se toma en cuenta la hipótesis de estado

estacionario. El único supuesto es que el proceso molecular (reacción química o enzimática) cumple la propiedad markoviana. La desventaja del modelo radica que es necesario determinar tiempos de reacción individual enzimática.

9) Resumen de constantes cinéticas y termodinámicas.

A continuación, se muestra un resumen de las constantes calculadas a partir de los modelos.

Tabla 24. Resumen de constantes de velocidad en ausencia y presencia de ppGpp

k	- ppGpp	+ ppGpp (200 μ M)
k_e (nt/s)	11.24 ± 4.8	19.85 ± 5.45
k_{e0} ($\times 10^8$ nt/s)	1.18	3.31
k_{cat} (s^{-1})	17.11 ± 0.10	16.83 ± 0.17
k_{b1} o k_p (s^{-1})	0.069 ± 0.046	0.139 ± 0.129
k_0 (s^{-1})	0.325 ± 0.035	0.56 ± 0.16
A (s^{-1})**	23.95 ± 3.23	67.26 ± 5.13

** Factor pre-exponencial de la ecuación de arhenius.

Tabla 25. Resumen de energías de activación en ausencia y presencia de ppGpp

k	- ppGpp	+ ppGpp (200 μ M)	$\Delta\Delta G$
ΔG_p^+ ($K_B T$)	5.58 ± 0.68	6.18 ± 0.93	0.6 ± 1.15
ϵ ($K_B T$)	4.36 ± 0.081	4.27 ± 0.077	0.09 ± 0.11
ΔG_{cat}^+ ($K_B T$)*	0.34 ± 0.13	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.13

* Obtenido a partir del k_{cat} y suponiendo que la reacción tiene el mismo factor pre-exponencial A.

X. CONCLUSIONES

1. El ppGpp aumenta la velocidad libre de pausas de la RNAP de *E. coli*; de 11.24 ± 4.8 a 19.85 ± 5.45 nt/s, mientras que la velocidad total (incluyendo pausas) no se modifica. La velocidad libre de pausas entre enzimas es heterogénea y se distribuye de forma normal, en presencia y ausencia de ppGpp.
2. La densidad (P_d) y distribución de pausas durante la elongación no se modifica (p-value, 0.096) en presencia de ppGpp. Sin embargo, el tiempo medio de duración de pausas se reduce de 8.4 ± 1.3 a 6.6 ± 0.7 s.
3. El ppGpp no modifica la naturaleza difusiva de las pausas. Es decir, las pausas son inducidas térmicamente por el medio. La energía de activación media en pausas (ϵ) es de 4.365 ± 0.081 y 4.271 ± 0.077 $K_B T$, en ausencia y presencia de ppGpp, respectivamente.
4. El ingreso a pausas, durante la elongación en la transcripción en la RNAP de *E. coli*, es cinética y termodinámicamente desfavorecido.
5. El ppGpp modifica la constante de velocidad en pausas k_0 , de 0.325 ± 0.035 a 0.56 ± 0.16 s^{-1} .
6. El ppGpp no modifica la constante de equilibrio (K_{eq}), pero aumenta la constante de ingreso a pausas (k_p) (o *first backtracking*, k_{b1}) de 0.069 ± 0.046 a 0.139 ± 0.129 s^{-1} . La energía de activación de ingreso a pausas (ΔG_p^+) es de 5.58 ± 0.68 y 6.18 ± 0.93 $K_B T$ en ausencia y presencia de ppGpp, respectivamente.
7. En presencia o ausencia de ppGpp, el mecanismo básico enzimático del *on-pathway* de la RNAP de *E. coli*, modelado como un sistema de 4 estados, no se modifica.
8. La constante de catálisis (condensación del NTP al extremo 3' del RNAm) no se modifica en presencia de 200 μM de ppGpp; de 17.11 ± 0.10 a 16.83 ± 0.17 s^{-1} . La

energía de activación de la condensación de los NTPs (ΔG_{cat}^+) es de 0.34 ± 0.13 y $0.25 \pm 0.02 K_B T$, en ausencia y presencia de ppGpp, respectivamente.

9. El ppGpp no modifica la energía de activación en pausas (ϵ), del ingreso a pausas (ΔG_p^+) y a nivel de catálisis (ΔG_{cat}^+), pero si aumenta el parámetro difusivo de la transcripción (A): de 23.95 ± 3.23 a $67.26 \pm 5.13 \text{ s}^{-1}$.

XI. RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudios de transcripción, a nivel de microscopía de pinzas ópticas, a diferentes temperatura (4 – 45 °C) (Mejia *et al.*, 2008) y en presencia de ppGpp, para obtener la energía libre de ingreso a pausas (ΔG_p^+) y de elongación (ΔG_e^+) de forma experimental y corroborar el modelo presentado en este estudio $\Delta \Delta G_{ii}^+ = \Delta \Delta G_i^+ = 0$.
- 2) Realizar estudios de transcripción, mediante microscopía de pinzas ópticas, con nucleosoma para determinar las constantes de velocidad k_1 , k_{-1} y k_p para analizar los cambios energéticos (Dangkulwanich *et al.*, 2013), de forma experimental, en presencia de ppGpp en el ingreso a pausas y en la cinética reversible entre el estado pre y pos-translocado.
- 3) Realizar estudios de transcripción, a nivel de microscopía de pinzas ópticas, con diferentes concentraciones de NTPs a 200 μ M de ppGpp para evaluar cambios en el K_m y V_{max} de la velocidad libre de pausas.
- 4) Realizar estudios de smFRET con fluoróforos a nivel del β' clamp y β jaw (Chakraborty *et al.*, 2012) para observar posibles cambios en el ajuste del dwDNA en los complejos de iniciación y elongación.
- 5) Evaluar el efecto de las sales en el K_D del 1-aminonaftaleno 4-sulfonato-ppGpp (AmNs-ppGpp) (Reddy, Raghavan, 1995) a nivel *in vitro*. Luego evaluar el efecto de las sales, a concentraciones que no afecten el K_D , (KCl y/o NaCl) en la reanudación o estabilidad de los CTE detenidos (“*stall* o *halted* complex”) en presencia de ppGpp.
- 6) Comprobar a nivel de microscopía de pinzas ópticas, si las mutantes RNAP “estrictas” β' R1148C y β' R780C (Barker *et al.*, 2001b; Zhou, Jin, 1998) generan

el mismo efecto observado en este estudio frente a la RNAP nativa: aumento exclusivo del parámetro difusivo A.

- 7) Realizar estudios *in vitro* de entrecruzamiento con análogos de ppGpp como el 6-tio-ppGpp o azido-ppGpp (Sato *et al.*, 2009; Chatterji *et al.*, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001), a nivel del β -fosfato, para confirmar si el ppGpp tiene doble forma de unión a la RNAP de *E. coli*.
- 8) Realizar estudios *in vitro* de la estabilidad de los CTE artificiales (Sidorenkov *et al.*, 1998) en presencia de ppGpp para evaluar si la desestabilización del híbrido RNA-DNA de la elongación en un blanco de acción.
- 9) Realizar estudios *in vitro* para evaluar si el ppGpp afecta la cooperatividad entre la RNAP y ribosoma.
- 10) Realizar estudios conjuntos, a nivel de microscopía de pinzas ópticas, con el regulador DksA y ppGpp para evaluar su cooperatividad positiva o negativa a nivel de A.
- 11) Realizar estudios *in vitro* y a nivel de microscopía de pinzas ópticas de la mutante $\beta' \Delta L429$ para evaluar si se mantiene o pierde el efecto del ppGpp sobre la RNAP.
- 12) Realizar estudios de elongación con microscopía de pinzas ópticas, modificando la fuerza aplicada sobre la RNAP y concentración de NTP. El objetivo de estos experimentos es ajustar la distribución de los *dwell time* cortos (< 1 s) a un proceso de 4 estados y evaluar que constantes efectivas de velocidad son dependiente de fuerza y/o concentración de NTPs.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABBONDANZIERI, Elio A, GREENLEAF, William, SHAEVITZ, Joshua, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*. 2006. Vol. 438, n° 7067, p. 460–465.

ABERG, Anna, FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, Jorge, CABRER-PANES, Juan David, SÁNCHEZ, Alex and BALSALOBRE, Carlos. Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2009. Vol. 191, n° 10, p. 3226–3236.

ADELMAN, Karen, LA PORTA, Arthur, SANTANGELO, Thomas, LIS, John, ROBERTS, Jeffrey and WANG, Michelle. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99, n° 21, p. 13538–13543.

ARTSIMOVITCH, Irina, PATLAN, Vsevolod, SEKINE, Shun-ichi, VASSYLYEVA, Marina, HOSAKA, Takeshi, OCHI, Kozo, YOKOYAMA, Shigeyuki and AVENUE, West. Structural Basis for Transcription Regulation by Alarmone ppGpp. *Cell*. 2004. Vol. 117, p. 299–310.

BAGCHI, Biman, BLAINEY, Paul and XIE, Sunney. Diffusion constant of a nonspecifically bound protein undergoing curvilinear motion along DNA. *The journal of physical chemistry. B*. 2008. Vol. 112, n° 19, p. 6282–6284.

BAI, Lu, SANTANGELO, Thomas and WANG, Michelle. Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2006. Vol. 35, n° 28, p. 343–60.

BAI, Lu, FULBRIGHT, Robert and WANG, Michelle. Mechanochemical kinetics of transcription elongation. *Physical review letters*. February 2007. Vol. 98, n° 6, p. 068103-1.

BARDALES, Jorge. “Estudio Estructural del efecto del ppGpp en los Complejos de Inicio de la Transcripción mediante Microscopia de Fuerza Atómica”. Asesor: Daniel Guerra Giraldez. Tesis para Título profesional, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Facultad de Ciencias y Filosofía, Lima-Perú, 2012.

BARKER, Melanie, GAAL, Tamas, JOSAITIS, Cathleen and GOURSE, Richard. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and *in vitro*. *Journal of molecular biology*. 2001. Vol. 305, n° 4, p. 673–88.

BARKER, Melanie, GAAL, Tamas and GOURSE, Richard. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *Journal of molecular biology*. 2001. Vol. 305, n° 4, p. 689–702.

BARTLETT, Michael, GAAL, Tamas, ROSS, Wilma and GOURSE, Richard. RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by *rrn* P1 promoters. *Journal of molecular biology*. 1998. Vol. 279, n° 2, p. 331–45.

BELOGUROV, Georgiy, VASSYLYEVA, Marina, SEVOSTYANOVA, Anastasiya, APPLEMAN, James, XIANG, Alan, LIRA, Ricardo, WEBBER, Stephen, KLYUYEV, Sergiy, NUDLER, Evgeny, ARTSIMOVITCH, Irina and VASSYLYEV, Dmitry. Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature*. 2009. Vol. 457, n° 7227, p. 332–5.

- BERNARDO, Lisandro, JOHANSSON, Linda, SOLERA, Dafne, SKÄRFSTAD, Eleonore and SHINGLER, Victoria. The guanosine tetraphosphate (ppGpp) alarmone, DksA and promoter affinity for RNA polymerase in regulation of sigma-dependent transcription. *Molecular microbiology*. 2006. Vol. 60, n° 3, p. 749–764.
- BLAINEY, Paul, LUO, Guobin, KOU, MANGEL, Walter, VERDINE, Gregory, BAGCHI, Biman and XIE, Sunney. Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA. *Nature structural & molecular biology*. 2009. Vol. 16, n° 12, p. 1224–1229.
- BRAEKEN, Kristien, MORIS, Martine, DANIELS, Ruth, VANDERLEYDEN, Jos and MICHIELS, Jan. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends in microbiology*. 2006. Vol. 14, n° 1, p. 45–54.
- BUSTAMANTE, Carlos, CHENG, Wei, MEJIA, Yara. Revisiting the central dogma one molecule at a time. *Cell*. 2011. Vol. 144, n° 4, p. 480–97.
- CABRERA, Julio, CAGLIERO, Cedric, QUAN, Selwyn, SQUIRES, Catherine and JIN, Ding Jun. Active transcription of rRNA operons condenses the nucleoid in *Escherichia coli*: examining the effect of transcription on nucleoid structure in the absence of transertion. *Journal of bacteriology*. 2009. Vol. 191, n° 13, p. 4180–5.
- CABRERA, Julio and JIN, Ding. The distribution of RNA polymerase in *Escherichia coli* is dynamic and sensitive to environmental cues. *Molecular microbiology*. 2003. Vol. 50, n° 5, p. 1493–1505.
- CAGLIERO, Cedric and JIN, Ding Jun. Dissociation and re-association of RNA polymerase with DNA during osmotic stress response in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 2013. Vol. 41, n° 1, p. 315–26.

CHAKRABORTY, Anirban, WANG, Dongye, EBRIGHT, Yon, KORLANN, You, KORTKHONJIA, Ekaterine, KIM, Taiho, CHOWDHURY, Saikat, WIGNESHWERARAJ, Sivaramesh, IRSCHIK, Herbert, JANSEN, Rolf, NIXON, Tracy, KNIGHT, Jennifer, WEISS, Shimon and EBRIGHT, Richard. Opening and Closing of the Bacterial RNA Polymerase Clamp. *Science*. 2012. Vol. 337, n° 6094, p. 591–595.

CHATTERJI, Dipankar, FUJITA, Nobuyuki and ISHIHAMA Akira. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the β -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes to cells*. May 1998. Vol. 3, n° 5, p. 279–87.

CHEMLA, Yann, MOFFITT, Jeffrey and BUSTAMANTE, Carlos. Exact solutions for kinetic models of macromolecular dynamics. *The journal of physical chemistry. B*. 2008. Vol. 112, n° 19, p. 6025–44.

CLELAND, Wallace. Partition analysis and the concept of net rate constants as tools in enzyme kinetics. *Biochemistry*. 15 July 1975. Vol. 14, n° 14, p. 3220–4.

COBAN, Oana, LAMB, Don, ZAYCHIKOV, Evgeny, HEUMANN, Hermann and NIENHAUS, Ulrich. Conformational heterogeneity in RNA polymerase observed by single-pair FRET microscopy. *Biophysical journal*. 2006. Vol. 90, n° 12, p. 4605–4617.

DALEBROUX, Zachary and SWANSON, Michele. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*. 2012. Vol. 10, n° 3, p. 203–212.

DANGKULWANICH, Manchuta, ISHIBASHI, Toyotaka, LIU, Shixin, KIRIEVA, Maria, LUBKOWSKA, Lucyna, KASHLEV, Mikhail and BUSTAMANTE, Carlos. Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *eLife*. January 2013. Vol. 2, p. e00971.

DAVENPORT, John, WUITE, Gijs, LANDICK, Robert and BUSTAMANTE, Carlos. Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by *E. coli* RNA polymerase. *Science*. 2000. Vol. 287, n° 5462, p. 2497–2500.

DEPKEN, Martin, GALBURT, Eric and GRILL, Stephan. The origin of short transcriptional pauses. *Biophysical journal*. 2009. Vol. 96, n° 6, p. 2189–2193.

EBRIGHT, Richard. RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of molecular biology*. 2000. Vol. 304, n° 5, p. 687–98.

EDERTH, Josefine, ARTSIMOVITCH, Irina, ISAKSSON, Leif and LANDICK, Robert. The downstream DNA jaw of bacterial RNA polymerase facilitates both transcriptional initiation and pausing. *The Journal of biological chemistry*. 2002. Vol. 277, n° 40, p. 37456–63.

FELLER, William, *An Introduction to Probability Theory and Its Applications*, Vol 1. Third edition. New York: Jhon Wiley and Sons, Inc, 1997. p. 470.

FLOYD, Daniel, HARRISON, Stephen and VAN OIJEN, Antoine. Analysis of kinetic intermediates in single-particle dwell-time distributions. *Biophysical journal*. 2010. Vol. 99, n° 2, p. 360–6.

FORDE, Nancy, IZHAKY, David, WOODCOCK, Glenna, WUITE, Gijs and BUSTAMANTE, Carlos. Using mechanical force to probe the mechanism of pausing and arrest during continuous elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99, n° 18, p. 11682–11687.

FURMAN, Ran, SEVOSTYANOVA, Anastasiya and ARTSIMOVITCH, Irina. Transcription initiation factor DksA has diverse effects on RNA chain elongation. *Nucleic acids research*. 2012. Vol. 40, n° 8, p. 3392–402.

FURMAN, Ran, TSODIKOV, Oleg, WOLF, Yuri and ARTSIMOVITCH, Irina. An insertion in the catalytic trigger loop gates the secondary channel of RNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 2013. Vol. 425, n° 1, p. 82–93.

GALBURT, Eric, GRILL, Stephan, WIEDMANN, Anna, LUBKOWSKA, Lucyna, CHOY, Jason, NOGALES, Eva, KASHLEV, Mikhail and BUSTAMANTE, Carlos. Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner. *Nature*. 2007. Vol. 446, n° 7137, p. 820–823.

GESZVAIN, Kati and LANDICK, Robert. The structure of bacterial RNA polymerase. *Web Site Edition*. 2005, pp. 1-12.

GORMAN, Jason and GREENE, Eric. Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA. *Nature structural & molecular biology*. 2008. Vol. 15, n° 8, p. 768–774.

GUTHOLD, Martin, ZHU, Xingshu, RIVETTI, Claudio, YANG, Guoliang, THOMSON, Neil, KASAS, Sandor, HANSMA, Helen, SMITH, Bettye Smith, HANSMA, Paul and BUSTAMANTE, Carlos. Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophysical journal*. October 1999. Vol. 77, n° 4, p. 2284–2294.

HARADA, Yoshie, OHARA, Osamu, TAKATSUKI, Akira, ITOH, Hiroyasu, SHIMAMOTO, Nobou and KINOSITA, Kazuhiko. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature*. 2001. Vol. 409, n° 6816, p. 113–5.

HEINEMANN, Marianne and WAGNER, Rolf. Guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase. *European journal of biochemistry/FEBS*. 1997. Vol. 247, n° 3, p. 990–999.

HERBERT, Kristina, GREENLEAF, William and BLOCK, Steven. Single-molecule studies of RNA polymerase: motoring along. *Annual review of biochemistry*. 2008. Vol. 77, p. 149–76.

HERBERT, Kristina, ZHOU, Jing, MOONEY, Rachel, PORTA, Arthur, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven. *E. coli* NusG inhibits backtracking and accelerates pause-free transcription by promoting forward translocation of RNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 2010. Vol. 399, n° 1, p. 17–30.

HODGES, Courtney, BINTU, Lacramioara, LUBKOWSKA, Lucyna, KASHLEV, Mikhail and BUSTAMANTE, Carlos. Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II. *Science*. 31 July 2009. Vol. 325, n° 5940, p. 626–628.

IYER, Lakshminarayan, KOONIN, Eugene and ARAVIND. DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology*. 2003. Vol. 23, p. 1–23.

JIN, Ding Jun and CABRERA, Julio. Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *Journal of structural biology*. 2006. Vol. 156, n° 2, p. 284–291.

JÖRES, Lars and WAGNER, Rolf. Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *The Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278, n° 19, p. 16834–16843.

KASAS, Sandor, THOMSON, Neil, SMITH, Bettye, HANSMA, Helen, ZHU, Xingshu, GUTHOLD, Martin, BUSTAMANTE, Carlos, KOOL, Eric, KASHLEV, Mikhail and HANSMA, Paul. *Escherichia coli* RNA Polymerase Activity Observed Using Atomic Force. *Biochemistry*. 1997. Vol. 36, n° 3, p. 461–8.

KINGSTON, Robert, NIERMANS, William and CHAMBERLIN, Michael. A Direct Effect of Guanosine Tetraphosphate on Pausing of *Escherichia coli* RNA Polymerase during RNA Chain Elongation. *The journal of biological chemistry*. 1981. Vol. 256, n° 26, p. 2787–2797.

KIREEVA, Maria, KOMISSAROVA, Natalia, WAUGH, David and KASHLEV, Mikhail. The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *The Journal of biological chemistry*. 2000. Vol. 275, n° 9, p. 6530–6536.

KRIEL, Allison, BITTNER, Alycia, KIM, Sok Ho, LIU, Kuanqing, TEHRANCHI, Ashley, ZOU, Winnie, RENDON, Samantha, CHEN, Rui, TU, Benjamin and WANG, Jue. Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. 2013. Vol. 48, n° 2, p. 231–241.

KROHN, Michael and WAGNER, Rolf. Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *The Journal of biological chemistry*. 1996. Vol. 271, n° 39, p. 23884–23894.

LARSON, Matthew, ZHOU, Jing, KAPLAN, Craig, PALANGAT, Murali, KORNBERG, Roger, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven. Trigger loop dynamics mediate the balance between the transcriptional fidelity and speed of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109, n° 17, p. 6555–6560.

LARSON, Matthew, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven. Single-molecule studies of RNA polymerase: one singular sensation, every little step it takes. *Molecular cell*. 2011. Vol. 41, n° 3, p. 249–62.

LEE, Donna, PHUNG, Le, STEWART, Judith and LANDICK, Robert. Transcription pausing by *Escherichia coli* RNA polymerase is modulated by downstream DNA sequences. *The Journal of biological chemistry*. 1990. Vol. 265, n° 25, p. 15145–53.

LEE, David, BUSBY, Stephen, WESTBLADE, Lars and CHAIT, Brian. Affinity isolation and I-DIRT mass spectrometric analysis of the *Escherichia coli* O157:H7 Sakai RNA polymerase complex. *Journal of bacteriology*. 2008. Vol. 190, n° 4, p. 1284–9.

LENNON, Christopher, ROSS, Wilma, MARTIN-TUMASZ, Stephen, TOULOKHONOV, Innokenti, VRENTAS, Catherine, RUTHERFORD, Steven, LEE, Jeong-Hyun, BUTCHER, Samuel and GOURSE, Richard. Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes & development*. 2012. Vol. 26, n° 23, p. 2634–46.

ŁYZEN, Robert, KOCHANOWSKA, Maja, WĘGRZYN, Grzegorz and SZALEWSKA-PALASZ, Agnieszka. Transcription from bacteriophage lambda pR promoter is regulated independently and antagonistically by DksA and ppGpp. *Nucleic acids research*. 2009. Vol. 37, n° 20, p. 6655–6664.

MAGNUSSON, Lisa, GUMMESSON, Bertil, JOKSIMOVIĆ, Predrag, FAREWELL, Anne and NYSTRÖM, Thomas. Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, n° 14, p. 5193–5202.

MAOILÉIDIGH, Dáibhid, TADIGOTLA, Vasisht, NUDLER, Evgeny and RUCKENSTEIN, Andrei. A unified model of transcription elongation: what have we learned from single-molecule experiments?. *Biophysical journal*. 2011. Vol. 100, n° 5, p. 1157–1166.

MECHOLD, Undine, POTRYKUS, Katarzyna, MURPHY, Helen, MURAKAMI, Katsuhiko S and CASHEL, Michael. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 2013. Vol. 41, n° 12, p. 6175–89.

MEJIA, Yara, MAO, Hanbin, FORDE, Nancy and BUSTAMANTE, Carlos. Thermal probing of *E. coli* RNA polymerase off-pathway mechanisms. *Journal of molecular biology*. 2008. Vol. 382, n° 3, p. 628–637.

MEJIA, Yara. “Single molecule studies of bacterial transcription under Force and Torque using Optical Tweezers”, Asesor: Carlos J. Bustamante, Jay T. Groves, Jan Liphardt. Tesis Doctoral, Universidad de California (UC), Berkeley, 2009.

MOFFITT, Jeffrey, CHEMLA, Yann and BUSTAMANTE, Carlos. Methods in statistical kinetics. *Methods Enzymology*. 2010. Vol. 475, p. 475:221-57.

MUKHERJEE, Raju and CHATTERJI, Dipankar. Stationary phase induced alterations in mycobacterial RNA polymerase assembly: A cue to its phenotypic resistance towards rifampicin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008. Vol. 369, n° 3, p. 899–904.

MUKHOPADHYAY, Jayanta, DAS, Kalyan, ISMAIL, Sajida, KOPPSTEIN, David, JANG, Minyoung, HUDSON, Brian, SARAFIANOS, Stefan, TUSKE, Steven, PATEL, Jay, JANSEN, Rolf, IRSCHIK, Herbert, ARNOLD, Eddy and EBRIGHT, Richard. The RNA polymerase “switch region” is a target for inhibitors. *Cell*. 2008. Vol. 135, n° 2, p. 295–307.

MURAKAMI, Katsuhiko. X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} holoenzyme. *The Journal of biological chemistry*. 2013. Vol. 288, n° 13, p. 9126–34.

MURRAY, Heath, SCHNEIDER, David, GOURSE, Richard and MALL, Henry. Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant. *Molecular cell*. 2003. Vol. 12, n° 4, p. 125–134.

NETTELS, Daniel, GOPICH, Irina, HOFFMANN, Armin and SCHULER, Benjamin. Ultrafast dynamics of protein collapse from single-molecule photon statistics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. Vol. 104, n° 8, p. 2655–60.

NEUMAN, Keir, ABBONDANZIERI, Elio, LANDICK, Robert, GELLES, Jeff and BLOCK, Steven. Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell*. 2003. Vol. 115, n° 4, p. 437–447.

PALANGAT, Murali, HITTINGER, Christopher and LANDICK, Robert. Downstream DNA selectively affects a paused conformation of human RNA polymerase II. *Journal of molecular biology*. 2004. Vol. 341, n° 2, p. 429–42.

PAUL, Brian, ROSS, Wilma, GAAL, Tamas and GOURSE, Richard. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*. 2004. Vol. 38, p. 749–70.

POTRYKUS, Katarzyna and CASHEL, Michael. (p)ppGpp: still magical?. *Annual review of microbiology*. January 2008. Vol. 62, p. 35–51.

POTRYKUS, Katarzyna, WEGRZYN, Grzegorz and HERNANDEZ, James. Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the λ dap(R) promoter. *The Journal of biological chemistry*. 2002. Vol. 277, n° 46, p. 43785–43791.

PUPOV, Danil, MIROPOLSKAYA, Nataliya, SEVOSTYANOVA, Anastasiya, BASS, Irina, ARTSIMOVITCH, Irina and KULBACHINSKIY, Andrey. Multiple roles of the RNA polymerase {beta}' SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation. *Nucleic acids research*. 2010. Vol. 38, n° 17, p. 5784–5796.

REDDY, Padmalatha S and RAGHAVAN, Arvind. Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Molecular microbiology*. 1995. Vol. 15, n° 2, p. 255–265.

RICCHETTI, Miria, METZGER, Wolfgang and HEUMANN, Hermann. One-dimensional diffusion of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase: a mechanism to facilitate promoter location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. July 1988. Vol. 85, n° 13, p. 4610–4.

RIEF, Matthias, ROCK, Ronald, MEHTA, Amit, MOOSEKER, Mark, CHENEY, Richard, SPUDICH, James, Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. June 2000. Vol. 97, n° 17, p. 9482–86.

RODRIGUEZ, Piere. “Probable role for Wrapping of DNA around RNA polymerase during Transcription Initiation in Bacteria”, Asesor: Daniel Guerra Giraldez, Tesis para Título profesional, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Facultad de Ciencias y Filosofía, Lima-Perú, 2010.

ROSS, Wilma, VRENTAS, Catherine, SANCHEZ-VAZQUEZ, Patricia, GAAL, Tamas and GOURSE, Richard. The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular cell*. 2013. Vol. 50, n° 3, p. 420–9.

RUTHERFORD, Steven, LEMKE, Justin, VRENTAS, Catherine, GAAL, Tamas, ROSS, Wilma and GOURSE, Richard. Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *Journal molecular biology*. 2007. Vol. 366, n° 4, p. 1243–1257.

SATO, Michio, TAKAHASHI, Kosaku, OCHIAI, Yuka, HOSAKA, Takeshi, OCHI, Kozo and NABETA, Kensuke. Bacterial alarmone, guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), predominantly binds the β' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 2009. Vol. 10, n° 7, p. 1227–33.

SCHNEIDER, David, ROSS, Wilma and GOURSE, Richard L. Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*. 2003. Vol. 6, n° 2, p. 151–156.

SHAEVITZ, Joshua, ABBONDANZIERI, Elio, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven M. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*. 2003. Vol. 426, n° 6967, p. 684–687.

SIDORENKOV, Igor, KOMISSAROVA, Natalia and KASHLEV, Mikhail. Crucial Role of the RNA:DNA Hybrid in the Processivity of Transcription. *Molecular cell*. 1998. Vol. 2, p. 55–64.

SMITH, Steven, CUI Yujia, and BUSTAMANTE, Carlos. Optical-Trap Force Transducer That Operates by Direct Measurement of Light Momentum. *Methods in enzymology*. 2003. Vol. 55, p. 134–162.

TOLIĆ-NØRRELYKKE, Simon, ENGH, Anita, LANDICK, Robert and GELLES, Jeff. Diversity in the rates of transcript elongation by single RNA polymerase molecules. *The Journal of biological chemistry*. 2004. Vol. 279, n° 5, p. 3292–3299.

TOULOKHONOV, Innokenti, SHULGINA, Irina and HERNANDEZ, James. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the β' -subunit. *The Journal of biological chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 2, p. 1220–5.

TRAXLER, Matthew, SUMMERS, Sean, NGUYEN, Huyen-Tran, ZACHARIA, Vineetha, HIGHTOWER, Aaron, SMITH, Joel and CONWAY, Tyrrell. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. June 2008. Vol. 68, n° 5, p. 1128–1148.

CHATTERJI, Dipankar and OJHA, Anil. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology*. 2001. Vol. 4, n° 2, p. 160–165.

VASSYLYEV, Dmitry, SEKINE, Shun-ichi, LAPTENKO, Oleg, LEE, Jookyung, VASSYLYEVA, Marina and BORUKHOV, Sergei and YOKOYAMA, Shigeyuki. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*. 2002. Vol. 417, n° 6, p. 712-719.

VINELLA, Daniel, POTRYKUS, Katarzyna, MURPHY, Helen and CASHEL, Michael. Effects on Growth by Changes of the Balance between GreA, GreB, and DksA Suggest Mutual Competition and Functional Redundancy in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2012. Vol. 194, n° 2, p. 261–273.

VOGEL, Ulla and JENSEN, Kaj Frank. Effects of Guanosine 3', 5'-Bisdiphosphate (ppGpp) on Rate of Transcription Elongation in Isoleucine-starved *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*. 1994. Vol. 269, n° 23, p. 16236–16241.

VRENTAS, Catherine, GAAL, Tamas, BERKMEN, Melanie, RUTHERFORD, Steven, HAUGEN, Shanil, ROSS, Wilma and GOURSE, Richard. Still looking for the magic spot:

the crystallographically-defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. 2009. Vol. 377, n° 2, p. 551–564.

WAGNER, Rolf. Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2002. Vol. 4, n° 3, p. 331–340.

WANG, Hong-Yun, ELSTON, Tim, MOGILNER, Alexander and OSTER, George. Force generation in RNA polymerase. *Biophysical journal*. 1998. Vol. 74, n° 3, p. 1186–202.

WOODY, A-Young, WOODY, Robert and MALCOLM, Alan. Effects of ppGpp on transcription by DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*: circular dichroism, absorption and specific transcription studies. *Biochimica et biophysica acta*. 1987. Vol. 909, n° 2, p. 115–125.

WU, Jun and XIE, Jianping. Magic spot: (p) ppGpp. *Journal of cellular physiology*. 2009. Vol. 220, n° 2, p. 297–302.

WUITE, Gijs, DAVENPORT, John, RAPPAPORT, Aaron and BUSTAMANTE, Carlos. An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophysical journal*. 2000. Vol. 79, n° 2, p. 1155–67.

WUNDERLICH, Bengt, NETTELS, Daniel, BENKE, Stephan, CLARK, Jennifer, WEIDNER, Sascha, HOFMANN, Hagen, PFEIL, Shawn and SCHULER, Benjamin. Microfluidic mixer designed for performing single-molecule kinetics with confocal detection on timescales from milliseconds to minutes. *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, n° 8, p. 1459–74.

XIE, Ping. Dynamics of backtracking long pauses of RNA polymerase. *Biochimica et biophysica acta*. 2009. Vol. 1789, n° 3, p. 212–219.

XIE, Ping. A dynamic model for processive transcription elongation and backtracking long pauses by multisubunit RNA polymerases. *Proteins*. 2012. Vol. 80, n° 8, p. 2020–34.

YIN, Hong, ARTSIMOVITCH, Irina, LANDICK, Robert and GELLES, Jeff. Nonequilibrium mechanism of transcription termination from observations of single RNA polymerase molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. Vol. 96, n° 23, p. 13124–9.

YIN, Hong, LANDICK, Robert and GELLES, Jeff. Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule. *Biophysical journal*. 1994. Vol. 67, n° 6, p. 2468–2478.

YIN, Hong, WANG, Michelle, SVOBODA, Karel, LANDICK, Robert, BLOCK, Steven and GELLES, Jeff. Transcription against an applied force. *Science*. 1995. Vol. 270, n° 5242, p. 1653–7.

YUZENKOVA, Yulia and ZENKIN, Nikolay. Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107, n° 24, p. 10878–10883.

ZAMFT, Bradley, BINTU, Lacramioara, ISHIBASHI, Toyotaka and BUSTAMANTE, Carlos. Nascent RNA structure modulates the transcriptional dynamics of RNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109, n° 23, p. 8948–8953.

ZHANG, Jinwei, PALANGAT, Murali and LANDICK, Robert. Role of the RNA polymerase trigger loop in catalysis and pausing. *Nature structural & molecular biology*. 2010. Vol. 17, n° 1, p. 99–104.

ZHOU, Huan-Xiang. Rate theories for biologists. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2010. Vol. 43, n° 2, p. 219–293.

ZHOU, Jing, HA, Kook Sun, LA PORTA, Arthur, LANDICK, Robert and BLOCK, Steven. Applied Force Provides Insight into Transcriptional Pausing and Its Modulation by Transcription Factor NusA. *Molecular Cell*. 2011. Vol. 44, n° 4, p. 635–646.

ZHOU, Yang Ying and JIN, Din Jun. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, n° 6, p. 2908–2913.

ZUO, Yuhong, WANG, Yeming and STEITZ, Thomas. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Molecular cell*. 2013. Vol. 50, n° 3, p. 430–6.

ZWANZIG, Robert. Diffusion in a rough potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. Vol. 85, n° 4, p. 2029–2030.

XIII. ANEXO

ANEXO 1. Calibración del microscopio de pinzas ópticas.

Se procedió a realizar la calibración de la detección de fuerza mediante el método de stokes (Smith *et al.*, 2003). Este método consiste en obtener datos de velocidad (V) y fuerza (F) del movimiento de una bolita de poliestireno (con diámetro conocido, $2.1\ \mu\text{m}$). Del cociente entre ambos parámetros se obtiene el coeficiente de fricción $F/V = \xi = 6\pi\eta R$ y luego se obtiene el diámetro calculado de la bolita (R); η es el constante de viscosidad del medio. A continuación se muestra el protocolo.

Realizar un correcto alineamiento de las trampas antes de realizar el test. Verificar que la diferencia de Iris/SUM (con y sin bolita) sea ~ 0.010 . Corroborar que las desviaciones en el PSD sean iguales y opuestas.

1. Poner cero PSD (sin bolita de poliestireno).
2. Atrapar una bolita ($2 - 3\ \mu\text{m}$ de diámetro) con una distribución de tamaño conocido.
3. Seleccionar Autoalign (ON).
4. Seleccionar nuevamente Autoalign (OFF).
5. Seleccionar "Stokes' test" (Tool/Stokes test). Tener cuidado en tener el Autoalign en ON. En la nueva ventana generada, observar tres *spot* que se mueven arriba y abajo debido a fuerzas térmicas; Xforce=green, Yforce=yellow, Zforce=blue.
6. Seleccionar ZeroForce.
7. Seleccionar Move motors XYZ. Para mover la cámara de fluidos
8. Mover (~ 10 diámetros fuera de la pipeta) en el eje X, Y y Z (rueda del mouse). Tener cuidado de no pegar la bolita en las paredes de la cámara.
9. Congelar la prueba Stokes pulsando la tecla "F" (Figura 25).

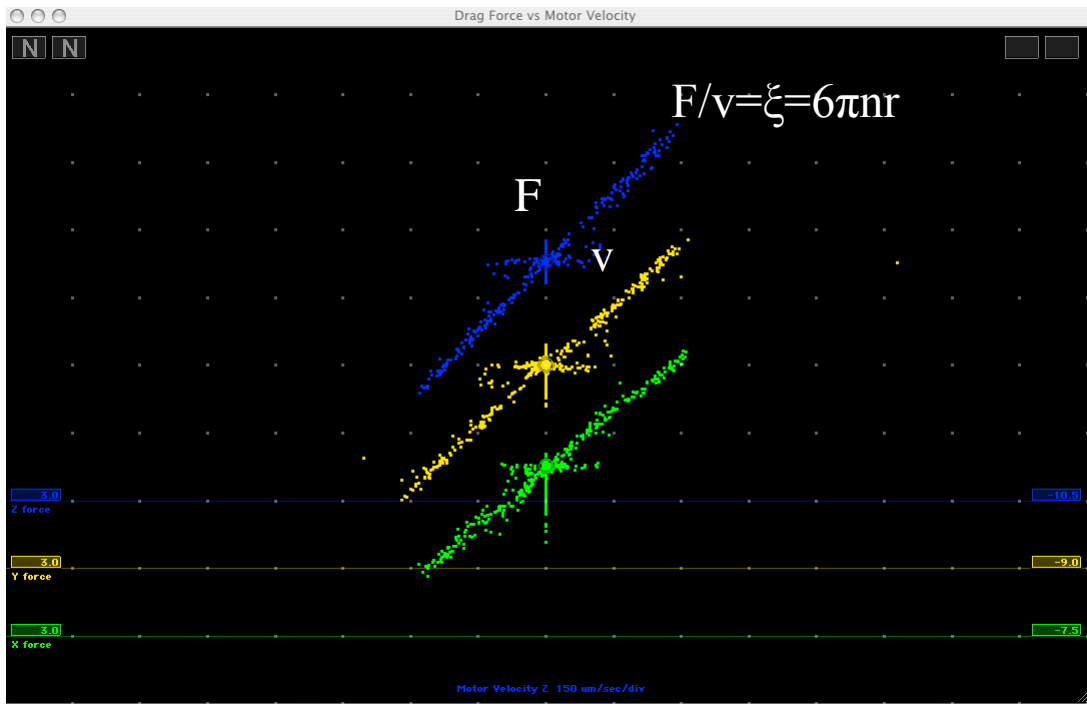


Figura 25. Ventana de la prueba de stokes; esta representan una gráfica de velocidad vs fuerza del movimiento de la bolita de poliestireno. Como se observa (ecuación) el cociente entre ambos valores genera una pendiente que equivale a $6\pi nR$. Al finalizar la prueba por cada bolita, la ventana nos expresa el diámetro de esta. El diámetro calculado por la ley de stokes (Figura 31) debe ser cercano al diámetro de la bolita comercial ($2.1\mu\text{m}$, para este caso).

10. Gire los patrones horizontales X e Y con las teclas "E" y "Q", respectivamente.
11. Pulse la tecla "E" y se mostrará el diámetro de la bolita calculado, en la esquina inferior izquierda de la pantalla.
12. Repetir para varias bolitas (Decongelar la pantalla con "E", borrar la data y apretar "o", re-cero *PSD* y obtener una nueva bolita).
13. Calcular el promedio de las mediciones y compararlo con lo mencionado por el fabricante. Si la coincidencia es correcta, todo está bien. En caso contrario,

considerar los factores de calibración: $\text{trapAForceSensitivity}[x,y,z]$ y $\text{trapBForceSensitivity}[x,y,z]$ deben ser cambiados.

Como se observa en la figura 26, el diámetro calculado mediante la ley de stokes muestra un valor de $2.19 \pm 0.39 \mu\text{m}$ cercano al del fabricante ($2.1 \mu\text{m}$). Además, la distribución de frecuencias se ajusta a una gaussiana ($R^2 = 0.94$). De lo mencionado, el microscopio de pinzas ópticas se encuentra calibrado y, por lo tanto, los experimentos ya se pueden llevar a cabo.

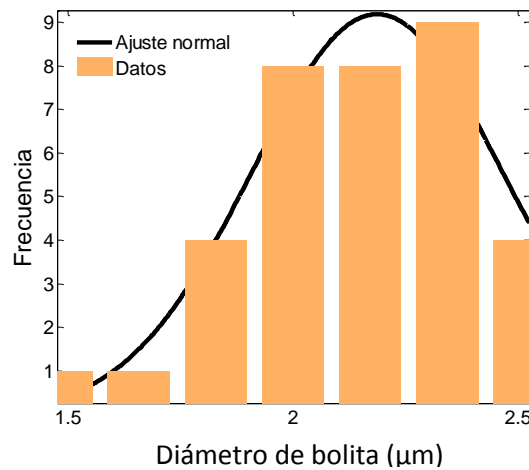


Figura 26. Distribución de frecuencias del diámetro de la bolita. Se observa un ajuste normal ($R^2 = 0.94$), con un valor de $2.19 \pm 0.39 \mu\text{m}$. Este se encuentra muy cercano al valor del fabricante, $2.1 \mu\text{m}$.

ANEXO 2. Ejemplos de ecuaciones para otros modelos en la cinética de motores moleculares.

Tabla 26. Ejemplos de reacciones (*on-pathway*) que son representadas por constantes de velocidad efectiva.

Mecanismo con constante de velocidad efectivas	Mecanismos ejemplos	Relación de constantes
$A \xrightarrow{k_x} B$	$A \xrightarrow{k_1[S]} B$	$k_x = k_1[S]$
	$A \xrightarrow{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C$	$k_x = k_1[S],$ $k_2 = k_y$
	$A \xrightleftharpoons[k_{-1}[P]]{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C$	$k_x = k_1 k_2 [S] / (k_{-1}[P] + k_2),$ $k_y = k_2$
$A \xrightarrow{k_x} B \xrightarrow{k_y} C$	$ \begin{array}{c} & & B_1 & & \\ & \nearrow^{k_1[S]} & & \searrow^{k_3} & \\ A & & & & C \\ & \searrow_{k_{-1}} & & \nearrow_{k_4} & \\ & & B_2 & & \\ & \nearrow_{k_2[S]} & & \searrow_{k_{-2}} & \end{array} $	$k_y = \frac{k_1 k_3}{k_{-1} + k_3} [S] + \frac{k_2 k_4}{k_{-2} + k_4} [S]$ $k_y = \frac{1}{2} \left(\frac{k_1 k_3}{k_{-1} + k_3} + \frac{k_2 k_4}{k_{-2} + k_4} \right) \frac{k_{-2} + k_4}{k_2}$
$A \xrightarrow{k_x} B \xrightarrow{k_y} C \xrightarrow{k_z} D$	$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B \xrightleftharpoons[k_{-2}[P]]{k_2[S]} C \xrightarrow{k_3} D$	$k_x = k_1 k_3 k_2 [S] / (k_3 k_2 [S] + k_3 k_{-1} + k_{-2} [P] k_{-1}),$ $k_y = k_3 k_2 [S] / (k_3 + k_{-2} [P]),$ $k_z = k_3$
	$A \xrightleftharpoons[k_{-1}[P]]{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$	$k_x = k_1 k_2 [S] / (k_2 + k_{-1} [P]),$ $k_y = k_2,$ $k_z = k_3$
	$A \xrightarrow{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$	$k_x = k_1 [S],,$ $k_y = k_2,$ $k_z = k_3$

Tabla 27. Ecuaciones de velocidad y constantes K_M y v_{max} de los ejemplos de la Tabla 26.

Reacción	K_M	v_{max}	Ecuación de velocidad
$A \xrightarrow{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C$	$\frac{k_2}{k_1}$	$k_2 \langle d \rangle$	$v = \frac{k_2[S]}{\frac{k_2}{k_1} + [S]} \langle d \rangle$
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}[P]]{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C$	$\frac{k_2 + k_{-1}[P]}{k_1}$	$k_2 \langle d \rangle$	$v = \frac{k_2[S]}{\frac{k_2 + k_{-1}[P]}{k_1} + [S]} \langle d \rangle$
	$\frac{1}{\left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_3} + \frac{k_2}{k_{-2} + k_4}\right)}$	$\left(\frac{k_1 k_3}{k_{-1} + k_3} + \frac{k_2 k_4}{k_{-2} + k_4}\right) \langle d \rangle$	$v = \frac{\left(\frac{k_1 k_3}{k_{-1} + k_3} + \frac{k_2 k_4}{k_{-2} + k_4}\right) [S]}{\left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_3} + \frac{k_2}{k_{-2} + k_4}\right) + [S]} \langle d \rangle$
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}[P]]{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$	$\frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3) k_1}$	$\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \langle d \rangle$	$v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [S]}{\frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3) k_1} + [S]} \langle d \rangle$
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B \xrightleftharpoons[k_{-2}[P]]{k_2[S]} C \xrightarrow{k_3} D$	$\frac{(k_{-2}[P] + k_3)(k_1 + k_{-1})}{k_2(k_3 + k_1)}$	$\frac{k_3 k_1}{k_3 + k_1} \langle d \rangle$	$v = \frac{\frac{k_3 k_1}{k_3 + k_1} [S]}{\frac{(k_{-2}[P] + k_3)(k_1 + k_{-1})}{k_2(k_3 + k_1)} + [S]} \langle d \rangle$
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}[P]]{k_1[S]} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D$	$\frac{(k_{-1}[P] + k_2) k_3}{(k_2 + k_3) k_1}$	$\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \langle d \rangle$	$v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [S]}{\frac{(k_{-1}[P] + k_2) k_3}{(k_2 + k_3) k_1} + [S]} \langle d \rangle$

ANEXO 3. Pérdida de memoria en reacciones moleculares

Se comentó el supuesto que las reacciones moleculares son consideradas un proceso Markov; sin embargo, esto no necesariamente es estricto. Las reacciones moleculares pueden tener cierto grado de memoria ya que la pérdida de memoria depende de lo siguiente: que la energía de activación (ΔG^+) sea grande con respecto a la diferencia de energía libre entre subestados dentro de cada estado. Es claro que la presencia de cierto grado de memoria no es posible hallarlo en una reacción elemental, pero sí una reacción consecutiva. Esto se explica de la siguiente manera: Si una reacción $A \xrightarrow{k_1} B$ o $B \xrightarrow{k_2} C$ tienen una distribución $\psi(t)_{A \rightarrow B} = k_1 e^{-k_1 t}$ y $\psi(t)_{B \rightarrow C} = k_2 e^{-k_2 t}$, es posible que si consideramos el proceso $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$, la distribución del paso $B \xrightarrow{k_2} C$ se vea afectada por un parámetro adicional?, ¿este parámetro es cuantificable?. Lo mostraremos a continuación

Para la reacción elemental $A \rightarrow B$, la ecuación de velocidad es:

$$\frac{dA}{dt} = -kA \quad (45)$$

Si resolvemos de forma inexacta obtenemos $A = R e^{-kt}$. Ya que la concentración inicial de A es $A_0 = A_t + B_t$. Donde la probabilidad de estar en A y B es $p_A = \frac{A_t}{A_0}$ y $p_B = \frac{B_t}{A_0}$, respectivamente. Reemplazando y dividiendo entre A_0 tenemos que la ecuación 45 se transforma en:

$$p_A = \frac{R}{A_0} e^{-kt} \quad (46)$$

Podemos imaginar que la distribución temporal para $A \rightarrow B$ es proporcional a la probabilidad del estado A. Entonces, la función de distribución temporal de la reacción de consumo de A es $\psi(t)_{A \rightarrow B} = M p_A$, reemplazando la ecuación 46 se obtiene

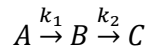
$$\psi(t)_{A \rightarrow B} = M \frac{R}{A_0} e^{-kt} \quad (47)$$

Podemos conocer MR/A_0 usando $1 = \int_0^{+\infty} \psi(t)_{A \rightarrow B} dt$, donde se obtiene que $M \frac{R}{A_0} = k$, reemplazando se obtiene la ecuación:

$$\psi(t)_{A \rightarrow B} = k e^{-kt} \quad (48)$$

Como vemos, resolviendo la ecuación 45 de forma inexacta podemos derivar la ecuación 48 que es la misma que la ecuación 17. Usando el mismo método vamos a derivar la función de distribución temporal para una cadena de dos reacciones.

Para una reacción de dos pasos:



Ya que para el primer paso $A \rightarrow B$, no hay pasos previos la ecuación de distribución temporal es $\psi(t)_{A \rightarrow B} = k_1 e^{-k_1 t}$ (igual que la ecuación 48). Además, usando la teoría de Cleland (Cleland, 1975), k_1 es una constante efectiva de velocidad (al igual que k_2). Debido a esto, se cumple que $A \xrightarrow{k_1} C$.

Para los estados B y C, tenemos que:

$$\frac{dB}{dt} = -k_2 B + k_1 A \quad (49)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_2 B = k_1 A \quad (50)$$

Sabemos que $A_0 = A + B + C$, derivando la ecuación 49 con respecto a B, se obtiene $\frac{d}{dt}\left(\frac{dB}{dt}\right) = -k_2 \frac{dB}{dt} + k_1 \frac{d}{dt}(A_0 - B - C)$. Ya que A_0 no cambia en el tiempo, entonces $\frac{dA_0}{dt} = 0$. Por lo tanto tenemos que:

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{dB}{dt}\right) = -k_2 \frac{dB}{dt} - k_1 \frac{dB}{dt} - k_1 k_2 B \quad (51)$$

Diferenciando de forma inexacta y dividiendo entre A_0 se obtiene:

$$\frac{1}{A_0} B = \frac{1}{A_0} M e^{-k_2 t} + \frac{1}{A_0} N e^{-k_1 t} \quad (52)$$

Ya que B/A_0 es la probabilidad de estar en B (p_B), entonces $p_B = \frac{1}{A_0} M e^{-k_2 t} + \frac{1}{A_0} N e^{-k_1 t}$. Una distribución temporal de formación y desaparición de B equivale a la distribución temporal de $A \rightarrow C$ ya que en la formación de B ocurre $A \rightarrow B$ y en la desaparición de B ocurre $B \rightarrow C$. Además, ya que la distribución de probabilidad temporal es proporcional a la probabilidad entonces:

$$\psi(t)_{A \rightarrow B \rightarrow C} = P p_B = \psi(t)_{A \rightarrow C} \quad (53)$$

Donde P es una constante de proporcionalidad. De la misma manera: $1 = \int_0^{+\infty} \psi(t)_{A \rightarrow C} dt$ y reemplazando 53 en 54 se obtiene:

$$1 = -\frac{1}{k_2} \frac{PM}{A_0} \int_0^{+\infty} e^{-k_2 t} d(-k_2 t) - \frac{1}{k_1} \frac{PN}{A_0} \int_0^{+\infty} e^{-k_1 t} d(-k_1 t) \quad (54)$$

Resolviendo se observa que $\frac{A_0}{P} = \frac{M}{k_2} + \frac{N}{k_1} = \frac{k_1 M + k_2 N}{k_1 k_2}$. Reemplazando en 53:

$$\left(\frac{k_1 k_2}{k_1 M + k_2 N}\right) (M e^{-k_2 t} + N e^{-k_1 t}) = \psi(t)_{A \rightarrow C} \quad (55)$$

Reordenando la ecuación 55 y reemplazando $N/M = \lambda$, se obtiene:

$$\left(\frac{k_1 k_2 \lambda}{k_1 + k_2 \lambda}\right) \left(\frac{1}{\lambda} e^{-k_2 t} + e^{-k_1 t}\right) = \psi(t)_{A \rightarrow C} \quad (56)$$

Cuando $\lambda = -1$ la ecuación se reduce a $\left(\frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2}\right) (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) = \psi(t)_{A \rightarrow C}$, la cual es la distribución suponiendo un proceso Markov para dos pasos (ecuación 20). Para corroborar esta idea es necesario realizar el ajuste de la distribución de *dwell time* de un motor molecular que tiene un *on-pathway* con 3 estados o dos reacciones consecutivas: Miosina V (Rief *et al.*, 2000). Como se observa en la Figura 27 y tabla 29, los datos experimentales muestran que el valor de λ es aproximadamente -1 cuando estos se ajustan a la ecuación 56. Como se observa, hemos demostrado que la propiedad markoviana de un proceso molecular es real.

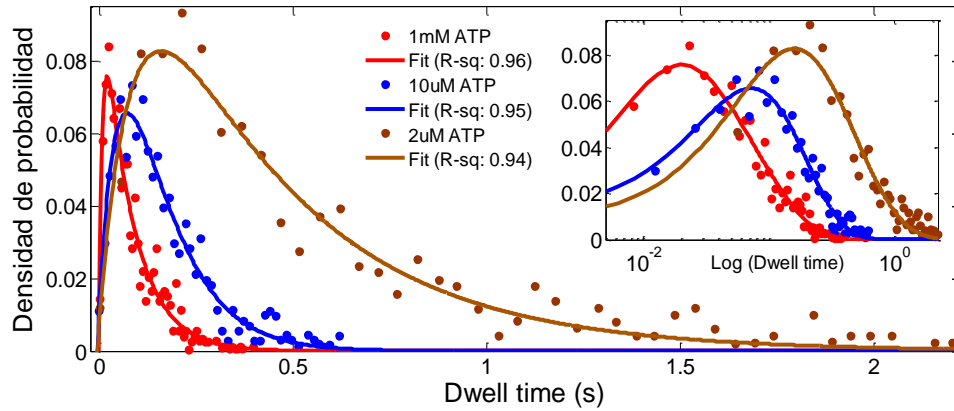


Figura 27. Ajuste de la distribución de *dwell time* del motor molecular Miosina V a la ecuación 57.

Los datos experimentales fueron de Rief *et al.*, (2000).

Tabla 29. Resumen de valores del ajuste de la figura 27

Experimento	k_y (s^{-1})	k_x (s^{-1})	$-\lambda$
1mM ATP	13.07 ± 1.61	120 ± 41.8	0.93 ± 0.19
10uM ATP	9.64 ± 4.24	16.90 ± 9.69	0.96 ± 1.7
2uM ATP	16.40 ± 4.47	2.55 ± 0.49	1.05 ± 0.42